

Aus dem Pharmakologischen Institut und dem Hygiene-Institut
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Über das mikrobielle Wachstum und seine Hemmbarkeit durch
Antibiotika im Perfusionsmedium des isolierten Rattenhirns

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz,
den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von
Klaus-Dieter Jasch
aus Rathenow

Mainz 1976

Aus dem Pharmakologischen Institut und dem Hygiene-Institut
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Über das mikrobielle Wachstum und seine Hemmbarkeit durch
Antibiotika im Perfusionsmedium des isolierten Rattenhirns

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz,
den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von
Klaus-Dieter Jasch
aus Rathenow

Mainz 1976



Fachbereichsdekan: Professor Dr. P. Klein

Referent: Professor Dr. J. Borneff

Korreferent: Professor Dr. Dr. J. Krieglstein

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Methoden	2
2.1. Beschreibung der Perfusionsapparatur	2
2.2. Zubereitung des Perfusionsmediums	4
2.3. Perfusionsmethode	7
2.4. Mikrobiologische Methoden	7
2.4.1. Keimzahlbestimmung	7
2.4.2. Züchtung von Reinkulturen und deren Differen- zierung	9
2.4.3. Färbung der Bakterien nach Gram	10
2.4.4. Fuchsin-Lactose-Agar nach Endo	10
2.4.5. Cytochromoxidase-Reaktion	11
2.4.6. Resistenzbestimmung	11
2.5. Beschreibung der Versuche	12
3. Ergebnisse	15
3.1. Ergebnisse der 8 Versuche ohne Antibiotikazusatz zum Perfusionsmedium	15
3.1.1. Keimzahl- und Keimartenbestimmung	15
3.1.2. Resistenzbestimmung	38
3.1.3. Überblick über die Versuche ohne Antibiotika- zusatz	48
3.2. Ergebnisse der 5 Versuche mit Zusatz von 1,0 mg% Tetracyclin zum Perfusionsmedium	53
3.2.1. Keimzahlbestimmung	53
3.2.2. Keimartenbestimmung	59
3.2.3. Resistenzbestimmung	64
3.2.4. Überblick über die Versuche mit Zusatz von 1,0 mg% Tetracyclin	70

	Seite
3.3. Ergebnisse der 3 Versuche mit Zusatz von 0,5 mg% Tetracyclin zum Perfusionsmedium	74
3.3.1. Keimzahl- und Keimartenbestimmung	74
3.3.2. Resistenzbestimmung	81
4. Diskussion	89
5. Zusammenfassung	92
Literaturverzeichnis	93
Lebenslauf	96

1. Einleitung

Den Perfusionsmedien isolierter Organe wurden häufig ohne nähere Begründung antibakterielle Substanzen zugesetzt. So enthalten 100 ml Perfusionsmedium für die isolierte Leber bei Bagglioni und Dewald (1968) 7,5 mg Chlortetracyclin, bei Schimassek (1968) 1,5 mg Oxytetracyclin, bei Willms und Söling (1968) 0,5 mg Ampicillin und bei Staib et al. (1968) 10,0 mg Ampicillin und 1,0 mg Oxytetracyclin. Young et al. (1955) setzten dem für die Zubereitung ihres Perfusionsmediums benötigten Kaninchenblut 25 mg Chlortetracyclin/700-750 ml zu. Geiger und Magnes (1947) versuchten, das Keimwachstum im Rinderblut, wenn es länger als 24 Stunden aufbewahrt wurde, durch Merthiolate-Na 1:20.000 zu hemmen. Brauer et al. (1951) gewannen das verwendete Rattenblut unter aseptischen Bedingungen, sterilisierten ihre Lösungen durch Filtration, die Perfusionsapparatur durch Autoklavieren und setzten ihrem Medium Oxytetracyclin zu.

Gegenstand der vorliegenden Untersuchung sollte sein, die Notwendigkeit des Zusatzes von Antibiotika bzw. Chemotherapeutika zum Perfusionsmedium des isolierten Rattenhirns experimentell zu prüfen, die Auswahl eines geeigneten Pharmakons durch mikrobiologische Untersuchungen zu treffen und die Wirksamkeit der gewählten Konzentration der antibakteriellen Substanz auf das Keimwachstum im Medium zu untersuchen.

2. Methoden

2.1. Beschreibung der Perfusionsapparatur

Für die Versuche wurde die Apparatur II nach Fleck et al. (1972) benutzt (Abb. 1). Durch die zwei voneinander getrennten Perfusionssysteme dieser Apparatur wurde es möglich, gleichzeitig mit einem Medium das isolierte Rattenhirn zu durchströmen (Perfusionskreislauf) und ein zweites identisches Medium im Parallelkreislauf zirkulieren zu lassen.

Die zwei als Vorratsgefäße dienenden Glaskolben (250 ml) wurden von einem Elektromotor um ihre Längsachse rotiert. Die beiden Kolben tauchten bis zu ihrem Kolbenhals in ein Wasserbad von 39 °C.

Vom tiefsten Punkt des Kolbens führte eine Zuleitung zu den Kolbenpumpen, deren Glasspritzen synchron von einem stufenlos regulierbaren Elektromotor (Laborrührer Type RZR, Heidolph Elektro KG, Kelkheim) bewegt wurden. Je ein Ventilsystem steuerte den Flüssigkeitsstrom zu einem Zweivegehahn. War dieser geschlossen, floß das Perfusionsmedium über einen Starlingwiderstand zurück in die Vorratsgefäße. Je ein Starlingwiderstand in beiden Kreisläufen hielt den gewählten Perfusionsdruck konstant.

Nach Öffnen des Zweivegehahns passierte das Medium einen Filter, das aus einer 4 mm dicken kreisrunden Glasfritte bestand (Porosität G 2, entsprechend einer Porenweite von 40 - 90 µg, Fa. Schott, Mainz). Dann floß das Medium über ein T-Stück durch zwei dünne PVC-Katheter in die Aa. carotides internae der Ratte. Nach Rattenhirnpassage tropfte das Perfusat aus allen bei der Präparation ange-

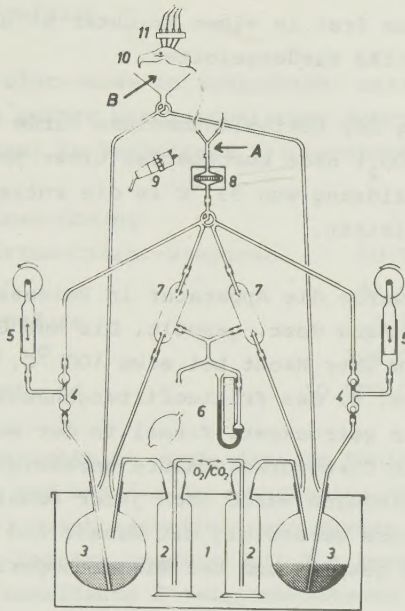


Abbildung 1: Apparatur II zur Perfusion des isolierten Rattenhirns nach Fleck et al. (1972).

- 1 Wasserbad (39 °C)
- 2 Waschflaschen für Carbogen mit physiologischer Kochsalzlösung
- 3 Vorratsgefäße für die Perfusionsmedien
- 4 und 5 Pumpen mit Ventilen
- 6 und 7 Starlingwiderstände mit Manometer
- 8 Filter
- 9 Druckkopf des Elektromanometers
- 10 Rattenschädel
- 11 Elektroden, die auf dem Rattenschädel sitzen
- A Entnahmestelle vor dem isolierten Rattenhirn
- B Entnahmestelle hinter dem isolierten Rattenhirn

schnittenen Venen frei in einen Trichter ab und wurde in das Vorratsgefäß zurückgeleitet.

Zur Oxygenierung des Perfusionsmediums wurde Carbogen (95 % O_2 + 5 % CO_2) nach Durchperlen einer physiologischen Kochsalzlösung von 39 °C in die rotierenden Sammelkolben geleitet.

Nach Benutzung wurde die Apparatur in Reiwasser gesäubert und dreimal mit Aqua dest. gespült. Die aus Glas bestehenden Teile wurden über Nacht bei etwa 100 °C, die Kunststoffteile wie z. B. das Frittenfiltergehäuse bei Zimmertemperatur getrocknet. Einmal in der Woche wurden die Glasteile in Chromschwefelsäure gereinigt. Das Frittenfilter hingegen wurde nach jeder Benutzung in Chromschwefelsäure gereinigt, mit Wasser und danach mit 1 % NaCl-Lösung gespült und bei Zimmertemperatur getrocknet.

Für jeden Versuch wurden fabrikneue, aber nicht sterilisierte Schlauchverbindungen und Katheter benutzt. Das Zusammensetzen der Perfusionsapparatur erfolgte ohne Beachtung aseptischer Kautelen.

2.2. Zubereitung des Perfusionsmediums

Das Perfusionsmedium wurde nach Krieglstein und Stock (1973) zubereitet: 40 ml bei 2000 g sedimentierte Rindererythrozyten und 4 g Rinder serumalbumin (trocken, "reinst", Behring-Werke, Marburg) wurden mit Krebs-Henseleit-Lösung, die 400 mg% Glukose enthielt, auf

100 ml aufgefüllt.

Das Rinderblut wurde im Schlachthof unsteril aufgefangan und sofort mit isotonischer Natriumcitrat-Lösung (siehe unten) im Verhältnis 1:1 verdünnt.

Natriumcitrat-Lösung

Tri-Natrium-Citrat-2-hydrat	80,0
NaCl	42,0
Zitronensäure	5,5
Glukose	204,0
Aqua dest. ad	10.000,0

Das Rindercitratblut wurde dann im Kühlraum bei 6 °C aufbewahrt und war bei Versuchsbeginn nicht älter als 48 Stunden. Durch Zentrifugieren wurden die Erythrocyten vom Plasma befreit, zweimal mit 1 % Kochsalzlösung und dann mit Stammlösung I (Zusammensetzung siehe unten) bei Zimmertemperatur gewaschen. 4 g Rinderserumalbumin wurden in etwa 20 ml Stammlösung I gelöst, bevor es zu dem Erythrozytenkonzentrat gegeben wurde. Die Krebs-Henseleit-Lösung (Krebs und Henseleit, 1932) wurde in zwei Stammlösungen angesetzt, von denen Stammlösung II bis zum Verbrauch im Kühlschränk aufbewahrt wurde. Stammlösung I wurde hingegen vor jedem Versuch frisch angesetzt. Die für die Zubereitung des Mediums benutzten Geräte und Flüssigkeiten waren nicht sterilisiert.

Stammlösung I:

Glukose	0,4 g
NaHCO ₃ -Lösung (1,3 %)	16,0 ml
Stammlösung II	ad 100,0 ml

Stammlösung II:

NaCl	(0,9 %)	0,154 M	100 Teile
KCl	(1,15 %)	0,154 M	4 Teile
CaCl ₂	(1,22 %)	0,11 M	3 Teile
KH ₂ PO ₄	(2,11 %)	0,154 M	1 Teil
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	(3,82 %)	0,154 M	<u>1 Teil</u>
			109 Teile

Während der 8 Versuche ohne Antibiotikazusatz zum Perfusionsmedium wurden 200 ml Medium für den Perfusions- und für den Parallelversuch gemeinsam angesetzt, so daß zu Beginn der Vorperfusion für die Medien beider Systeme der gleiche Gehalt an bakteriellen Verunreinigungen angenommen werden konnte.

In 5 Perfusionsversuchen wurde dem Medium 1 mg% Tetracyclin zugesetzt. 10 mg Tetracyclin wurden in einigen Tropfen NaOH gelöst und mit 0,9 % NaCl-Lösung auf 10 ml aufgefüllt. 1 ml der Tetracyclin-Lösung wurde zu dem Erythrozytenkonzentrat und der Albuminlösung gegeben. Dann wurde mit der Krebs-Ringer-Henseleit-Lösung, die 400 mg% Glukose enthielt, auf 100 ml aufgefüllt. In 3 Perfusionsversuchen wurde dem Medium 0,5 mg% Tetracyclin zugesetzt. 5 mg Tetracyclin wurden wie oben beschrieben in physiologischer Kochsalzlösung gelöst. 1 ml dieser Tetracyclin-Lösung wurde dem Perfusionsmedium beigelegt.

Zur Bestimmung des Hämatokrits der Perfusionsmedien diente eine Mikrohämatokrit-Zentrifuge (Haereus-Christ, Osterode). Der Hämatokritwert betrug 28 bis 31 %.

2.3. Perfusionsmethode

Männliche Sprague-Dawley-Ratten (200 - 300 g) wurden nach der Methode von Andjus et al. (1967) präpariert. Das isolierte Rattenhirn bestand aus dem Schädel mit Inhalt, Unterkiefer und Muskelresten sowie aus den oberen 3 bis 4 Halswirbeln. Das Perfusionsmedium wurde beiderseits in die A. carotis interna infundiert und floß über alle bei der Präparation angeschnittenen Venen frei ab.

2.4. Mikrobiologische Methoden

Die Vorbereitung und Durchführung der isolierten Rattenhirnperfusion erfolgte bewußt unter den üblichen experimentellen Bedingungen des pharmakologischen Laboratoriums ohne Beachtung eines keimfreien Arbeitens. Der mikrobiologische Teil der Arbeit wurde hingegen unter sterilen Bedingungen ausgeführt. Die Glas- und Metallgeräte wurden im Heißluftsterilisator bei 200 °C 4 Stunden sterilisiert, die Nährböden und die physiologische Kochsalzlösung bei 121 °C 20 min autoklaviert. Die Entnahme der Proben erfolgte mit sterilen Pipetten, Einmal-Spritzen und Reagenzgläsern.

2.4.1. Keimzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl wurde das Koch'sche Gußplattenverfahren (Hallmann, 1961) gewählt.

Unmittelbar nach Entnahme wurde von jeder Probe eine

Verdünnungsreihe von 10^{-1} - 10^{-6} angelegt: 1 ml der Probe wurde in ein Reagenzglas mit 9 ml sterilisierter physiologischer Kochsalzlösung pipettiert. Nach gründlichem Durchmischen wurde 1 ml der 1:10 verdünnten Probe in ein weiteres Reagenzglas mit 9 ml physiologischer Kochsalzlösung pipettiert usw. bis zu einer Verdünnung von 10^{-6} .

Sterile Einmal-Petrischalen wurden mit je 1 ml der hergestellten Verdünnungen beschickt. Dazu wurden etwa 15 ml im Wasserbad verflüssigter, auf etwa 50°C abgekühlter Standard-I-Nähragar (E. Merck AG, Darmstadt) gegeben. Bei geschlossenem Deckel wurde der Inhalt der Petrischalen unter Achterbewegungen durchmischt. Nach Erstarren des Agars wurde noch eine dünne Schicht Standard-I-Nähragar aufgetragen, um ein Überschwärmen durch aerobe Sporenbildner zu verhindern. Zur Kontrolle steriler Arbeitsbedingungen diente für jede Verdünnungsreihe eine Leerplatte mit 1 ml der verwendeten physiologischen Kochsalzlösung und etwa 15 ml des Standard-I-Nähragars.

Die Petrischalen wurden im Brutschrank bei 37°C bebrütet. Nach 48 Stunden wurden die aus den einzelnen Keimen entstandenen Kolonien mit dem bloßen Auge gezählt. Für die Berechnung der Gesamtkeimzahl wurden die zwei Platten mit der geringsten Verdünnung gewählt, die nur so dicht be wachsen waren, daß eine einwandfreie Zählung der Kolonien möglich war. Die Keimzahl pro ml ergab sich aus dem Produkt der gezählten Keime einer Agargußplatte und dem Quotienten der Verdünnungsstufe. Die Gesamtkeimzahl wurde aus dem arithmetrischen Mittel der Teilergebnisse der beiden Verdünnungsstufen gebildet.

2.4.2. Züchtung von Reinkulturen und deren Differenzierung

Mit dem Material einer Probe wurden ferner Oberflächenkulturen auf Standard-I-Nähragar angelegt. Die Bebrütung erfolgte während 48 Stunden bei 37 °C. Je Probe wurden willkürlich 10 sicher einzeln stehende Kolonien, die sich aus einem Keim entwickelt hatten, mit der Impföse entnommen und auf eine weitere Standard-I-Nähragar-Platte zur Anreicherung überimpft. Die Platte wurde dann 24 Stunden bei 37 °C bebrütet. Die Keime dieser Reinkulturen wurden 1. nach Gram gefärbt, 2. auf Fuchsin-Lactose-Agar nach Endo (E. Merck AG, Darmstadt) überimpft, 3. der Cytochromoxidase-Reaktion unterworfen und 4. mittels des Papierblättchen-Agardiffusionsverfahrens auf ihre Empfindlichkeit gegen Antibiotika und Chemotherapeutika getestet. Zur groben Differenzierung der Keime diente das in Tabelle 1 dargestellte Schema.

Tabelle 1: Schema zur Differenzierung der gezüchteten Keime

	Gram- verhalten	Form	Rötung auf Endo	Cytochrom- oxidase
Pseudomonas	-	Stäbchen	+/-	+
Koliforme	-	Stäbchen	+	-
sonst. gramneg. Stäbchen	-	Stäbchen	-	-
grampositive Kokken	+	Kokken	-	-
grampositive Stäbchen	+	Stäbchen	-	-
sonst. Keime	+/-		-	-

2.4.3. Färbung der Bakterien nach Gram

Mit der Impföse wurden Bakterien der Reinkultur, die nicht älter als 24 Stunden waren, auf einen fettfreien Objektträger in einem Tropfen Wasser suspendiert und hitzefixiert. Zur Kontrolle der Güte der Färbung wurden auf jeden Objektträger grampositive Staphylokokken und gramnegative Colibakterien aufgetragen.

Für die Gram-Färbung wurden folgende Reagenzien benutzt:

GRAMS Karbolgentianaviolettlösung f. d. Mikr. Merck

LUGOLS Lösung

96 % Äthanol, vergällt

verdünnte Karbolfuchsinlösung

ZIEHL-NEESENS Karbolfuchsinlösung

f. d. Mikr. Merck (filtriert) 10 ml

Aqua dest. ad 100 ml

Auf die hitzefixierten Ausstriche wurde Karbolgentianaviolett durch ein Filter aufgeträufelt, 3 min gefärbt und danach abgegossen. Dann wirkte für 2 min LUGOLSCHE Lösung ein. In Äthanol wurde so lange entfärbt, bis keine Farbwolken mehr abgingen. Danach wurde mit reichlich Wasser abgespült und eine Minute mit verdünnter Karbolfuchsinlösung nachgefärbt.

2.4.4. Fuchsin-Lactose-Agar nach Endo

Keime der Reinkultur wurden auf Petrischalen mit Fuchsin-Lactose-Agar nach Endo (E. Merck AG, Darmstadt) überimpft und 24 Stunden bei 37 °C bebrütet, um den Anteil der koliformen Bakterien innerhalb der Gesamtkeimzahl abzuschätzen

zu können. Alle rot wachsenden, aus gramnegativen Stäbchen bestehenden Kolonien wurden als Koliforme gewertet.

2.4.5. Cytochromoxidase-Reaktion

Die Cytochromoxidase-Reaktion (Hallmann, 1961) diente zur Erkennung der Pseudomonaden. Gleiche Teile einer 1 % alkoholischen α -Naphthollösung und einer etwa 1 % wässrigen Lösung von N,N-Dimethyl-p-phenylendiamin-Oxalat wurden vermischt. 1 Tropfen dieser Lösung wurde auf eine einzeln stehende Kolonie der auf Nähragar angelegten Reinkultur gegeben. Alle aus gramnegativen Stäbchen bestehenden Kolonien, die nach 60 sec. eine blaue bis schwarze Farbe annahmen, wurden als Pseudomonaden bezeichnet.

2.4.6. Resistenzbestimmung

Die Keime der Reinkulturen wurden nach dem Papierblättchen-Agardiffusionsverfahren auf ihre Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika und Chemotherapeutika geprüft (Linzenmeier 1962 und 1965, Wallhäuser 1970).

2 Petrischalen mit etwa 15 ml erstarrtem Oxoid Diagnostic Sensitivity Test Agar (Oxoid Limited, London) wurden mit 0,2 ml steriler physiologischer Kochsalzlösung beschickt. Mit einem sterilen Glasspatel wurden Keime der Reinkultur gleichmäßig auf der Oberfläche der Agarplatte verteilt. Auf diese Suspension wurden die antibiotikahaltigen Testplättchen gelegt. Die geschlossenen Petrischalen wurden dann zur Vordiffusion 2 Stunden im Kühlraum bei 4 °C auf-

bewahrt und anschließend 24 Stunden bei 37 °C bebrütet. Als sensibel gegen ein Antibiotikum bzw. Chemotherapeutikum in den getesteten Dosen wurden Keime bezeichnet, deren Hemmhof größer als 15 mm im Durchmesser war.

Die Teststerne und -blättchen der Fa. Oxoid Limited, London enthielten folgende Substanzen (Blättchendosis in Klammern): Ampicillin (25 µg), Carbenicillin (100 µg), Cephaloridin (5 µg), Chloramphenicol (10 µg und 50 µg), Cloxacillin (5 µg), Erythromycin (10 µg), Gentamycin (10 µg), Nalidixinsäure (30 µg), Neomycin (10 µg), Nitrofurantoin (200 µg), Penicillin (1,5 E), Polymycin B (300 E), Sulfadiazin (50 µg), Tetracyclin (10 µg und 50 µg) und Trimethoprim/Sulfamethoxazol (25 µg).

2.5. Beschreibung der Versuche

Es wurden 8 Perfusionsversuche ohne antibakteriellen Zusatz zum Perfusionsmedium durchgeführt. Simultan zum Medium des Perfusionskreislaufes zirkulierte im Parallelkreislauf der Perfusionsapparatur ein Medium gleicher Zusammensetzung. Zu Beginn der Zirkulation des Mediums in der Perfusionsapparatur wurden je 1,5 ml Perfusionsmedium, Rindercitratblut, Stammlösung I und II aus den Gefäßen für die Zubereitung bzw. Aufbewahrung entnommen. Die Zeit, die bis zum Beginn der Perfusion verging, war bedingt durch die Präparation des Rattenhirns nach Andjus et al. (1967) und betrug im Mittel 76 min (von 40 bis 120 min). Während der Versuche 1 und 2 wurden die Katheter, Filter und Filtergehäuse erst unmittelbar vor Anschluß an das Rattenhirn vom Perfusionsmedium durchströmt. Da sich in diesen beiden Versuchen große Unterschiede zwischen der Keimzahlzunahme im Perfusions- und Parallelkreislauf zeigten und

vermutet wurde, daß diese Differenzen zum Teil auf der bakteriellen Verunreinigung der Filtereinrichtung beruhen, wurde ab Versuch 3 auch dieser Geräteteil bis zum Beginn der Perfusion mit fünfminütigem Wechsel vom Medium des späteren Perfusions- und Parallelkreislaufs durchströmt.

Unmittelbar vor Einlegen der Katheter in die Aa. carotides internae der Ratte wurde eine Probe in ein steriles Reagenzglas aufgefangen (Beginn der Rattenhirnperfusion). Nach einer Perfusionszeit von 60, 120, 180 und 240 min wurde jeweils eine Probe aus dem mit Alkohol desinfizierten Gummischlauch, der das Frittenfilter mit dem T-Stück verband, vor dem isoliert perfundierten Rattenhirn mit einer sterilen Einmal-Spritze entnommen. Gleichzeitig wurde eine zweite Probe durch Auffangen des nach der Rattenhirnpassage frei abtropfenden Mediums gewonnen. Aus dem Parallelkreislauf erfolgte die Entnahme der Proben zu Beginn der Rattenhirnperfusion, nach 60, 120, 180 und 240 min Perfusion aus einem mit Alkohol desinfizierten Gummistopfen mit einer sterilen Einmalspritze. Das Material der entnommenen Proben wurde wie oben beschrieben mikrobiologisch untersucht.

Ferner wurden 5 Perfusionsversuche mit 1,0 mg Tetracyclin/100 ml Perfusionsmedium und 3 Perfusionsversuche mit 0,5 mg Tetracyclin/100 ml Perfusionsmedium durchgeführt. Auf die Inbetriebnahme des Parallelkreislaufs wurde verzichtet, da sich in den vorangegangenen Versuchen im Mittel kein wesentlicher Unterschied im Keimzahlverhalten zwischen Perfusions- und Parallelkreislauf fand. Die Entnahme der Proben erfolgte wie oben beschrieben. Zusätzlich wurde noch Erythrozytenkonzentrat nach dem

letzten Zentrifugieren untersucht. Von allen Proben wurde die Gesamtkeimzahl bestimmt. Differenziert und auf ihre Sensibilität geprüft wurden hingegen nur die Keime, die aus den Proben des Perfusionsmediums zu Beginn der Zirkulation und Perfusion und vor dem Rattenhirn gezüchtet wurden. Während dieser Versuche zirkulierte das Medium bis zu Beginn der Rattenhirnperfusion zwischen 30 min und 50 min in der Apparatur.

3. Ergebnisse

3.1. Ergebnisse der 8 Versuche ohne Antibiotikazusatz zum Perfusionsmedium

3.1.1. Ergebnisse der Keimzahl- und Keimartenbestimmung

Versuch 1, 2 und 5 ohne Antibiotikazusatz zum Perfusions- medium

Die Versuche 1, 2 und 5 werden zusammen besprochen, da sie Ähnlichkeiten in Bezug auf Keimzahlanstieg und Keimartenverschiebung während der Perfusionszeit aufweisen.

Die Gesamtkeimzahlen der Perfusionsmedien in den Versuchen 1, 2 und 5 lagen zu Beginn der Zirkulation des Mediums in der Perfusionsapparatur zwischen den Keimzahlen der verwendeten Stammlösungen und des benutzten Rindercitratblutes (Tab. 2, 4 und 6). Das Erythrozytenkonzentrat war während der Versuche ohne Antibiotikazusatz zum Perfusionsmedium nicht untersucht worden, so daß keine Rückschlüsse auf die Veränderungen der Keimzahlen und die Verschiebungen der Keimarten durch die Zubereitung des Rindercitratblutes gezogen werden können. Desgleichen wurden die Albuminlösungen nicht untersucht. Nach Mitteilung der Behring-Werke AG, Marburg, beträgt der maximale Keimgehalt weniger als 50 Keime pro Gramm Serum-Albumin vom Rind, trocken, "reinst".

In den Versuchen 1, 2 und 5 stieg die Keimzahl im Parallelkreislauf geringer an als bei Entnahme der Proben aus dem Perfusionskreislauf sowohl vor als auch hinter dem isoliert perfundierten Rattenhirn (Tab. 2, 4 und 6). Der unterschiedliche Keimzahlanstieg im Perfusions- und Parallelkreislauf zeigte sich schon bei Entnahme der Proben unmittelbar vor Einlegen der Katheter in die Aa. carotides internae der Ratte zu Beginn der Perfusion, so

daß zu diesem Zeitpunkt ein Einfluß des Rattenhirns auf das mikrobielle Wachstum ausgeschlossen werden kann. Die Unterschiede im Keimzahlanstieg können auf der Ausbildung einer temporär unterschiedlichen Bakterienflora in den beiden Kreisläufen beruhen. Diese Annahme wird durch das Verhalten der grampositiven Stäbchen in den beiden Kreisläufen anschaulich belegt (Tabelle 3 und 5).

Während der Versuche 1 und 2 wurden die Katheter erst kurz vor Einlegen in die Aa. carotides internae vom Medium des späteren Perfusionskreislaufs durchströmt. Da vermutet wurde, daß der Unterschied im Keimzahlanstieg zwischen Parallel- und Perfusionskreislauf zum Teil auf Verunreinigungen beruht, die durch das nicht sterile Filtersystem eingeschleppt werden, wurde während des Versuchs 2 eine Probe aus den Kathetern und eine Probe aus dem Vorratsgefäß des Perfusionskreislaufs unmittelbar vor Beginn der Perfusion entnommen. In der Probe, die aus den Kathetern aufgefangen wurde, fand sich eine Gesamtkeimzahl von 20 000 Keimen/ml. Für die Probe aus dem Vorratsgefäß wurde hingegen nur eine Gesamtkeimzahl von 8 000 Mikroorganismen/ml ermittelt. Das spricht für eine bakterielle Verunreinigung des Filtergehäuses, in dem wahrscheinlich während der Trocknung bei Raumtemperatur über 12 Stunden ein Keimwachstum stattfinden konnte.

Die Keimzahlen der Proben, die zum gleichen Beobachtungszeitpunkt vor und hinter dem isoliert perfundierten Rattenhirn entnommen wurden, zeigten wie auch in allen übrigen Versuchen nur geringe Abweichungen, die durch die Ungenauigkeit der Methode zur Keimzahlbe-

stimmung und den Einfluß des isoliert perfundierten Rattenhirns auf die Keimverteilung bedingt sein können.

In den 3 Versuchen stiegen die Keimzahlen zwischen den Beobachtungszeitpunkten im allgemeinen an. Nur im Versuch 1 wurde zwischen 60 und 120 min Perfusion bei Entnahme der Proben vor und hinter dem isoliert perfundierten Rattenhirn und bei Entnahme der Probe aus dem Parallelkreislauf eine geringfügige Abnahme der Keimzahl beobachtet, die sich im Bereich der methodischen Fehlergrenzen bewegt.

In den Proben der Versuche 1 und 2 ohne Antibiotikazusatz zum Perfusionsmedium befanden sich zu Beginn der Zirkulation des Mediums in der Perfusionsapparatur unter den 10 isolierten Keimen am häufigsten grampositive Kokken (Tab. 3 und 5), deren relativer Anteil auch in den für diese Versuche verwendeten Stammlösungen groß war. Mit der Perfusionszeit nahm der relative Anteil der grampositiven Kokken an allen 3 Probeentnahmestellen stark ab. Der Anteil der grampositiven Stäbchen nahm hingegen stark zu. Bei Entnahme der Proben aus dem Parallelkreislauf war der relative Anstieg der grampositiven Stäbchen erst 60 min später zu beobachten, was den geringeren Keimzahlanstieg im Parallelkreislauf erklären könnte.

In den Stammlösungen und im Rindervollblut, die für den Versuch 5 verwendet wurden, fanden sich überwiegend grampositive Kokken. Im Perfusionsmedium hingegen wurden schon vor Beginn der Zirkulation des Mediums in der Perfusionsapparatur von den 10 untersuchten Keimen 9 als grampositive Stäbchen differenziert, deren relativer An-

Tabelle 2: Versuch 1 ohne Tetracyclin: Keimzahlbestimmung

Die Gesamtkeimzahl der Stammlösungen, des Rindercitratblutes und des Perfusionsmediums (zu verschiedenen Zeitpunkten und an verschiedenen Stellen der Kreisläufe entnommen) wurde mittels des Agargußplattenverfahrens ermittelt. Bis zum Beginn der Perfusion zirkulierte das Medium 65 min in der Apparatur.

Untersuchte	Flüssigkeit	Entnahmestelle	Entnahmezeit	Keimzahl/ml
Stammlösung I		Zubereitungsgefäß	Zirkulationsbeginn	1 300
Stammlösung II		Aufbewahrungsgefäß	Zirkulationsbeginn	3 200
Rindercitratblut		Aufbewahrungsgefäß	Zirkulationsbeginn	9 800
Perfusionsmedium		Zubereitungsgefäß	Zirkulationsbeginn	7 000
"		Perfusionskreislauf	Perfusionsbeginn	21 000
"		Vor dem Rattenhirn	60 min Perfusion	43 000
"		"	120 min Perfusion	29 000
"		"	180 min Perfusion	64 000
"		"	240 min Perfusion	260 000
"		Hinter dem Rattenhirn	60 min Perfusion	32 000
"		"	120 min Perfusion	29 000
"		"	180 min Perfusion	64 000
"		"	240 min Perfusion	220 000
"		Parallelkreislauf	Perfusionsbeginn	10 000
"		"	60 min Perfusion	13 000
"		"	120 min Perfusion	15 000
"		"	180 min Perfusion	31 000
"		"	240 min Perfusion	49 000

Tabelle 3: Versuch 1 ohne Tetracyclin: Keimartenbestimmung

Jeweils 10 Keime (den Stammlösungen, dem Rinderцитratblut und dem Perfusionsmedium zu verschiedenen Zeitpunkten und an verschiedenen Stellen der Kreisläufe entnommen) wurden nach Tabelle 1 differenziert.

Keimreservoir	Entnahmestelle	Entnahmezeit	sonst.			
			Pseudo- Koli- monaden	gramneg. Stäbchen	grampos. Kokken	grampos. Stäbchen
Stammlösung I	Zubereitungsgefäß	Zirkulationsbeginn	1	3	2	4
Stammlösung II	Zubereitungsgefäß	Zirkulationsbeginn	2	1	2	3
Rinderцитratblut Gefäß		Zirkulationsbeginn	-	6	3	-
Perfusionsmedium	Zubereitungsgefäß	Zirkulationsbeginn	-	-	3	6
"	Vor dem Rattenhirn	Perfusionsbeginn	-	1	-	-
"	"	60 min Perfusion	-	2	-	-
"	"	120 min Perfusion	-	1	-	-
"	"	180 min Perfusion	-	-	-	-
"	"	240 min Perfusion	-	4	-	1
"	Hinter dem Rattenhirn	60 min Perfusion	-	-	-	1
"	"	120 min Perfusion	-	-	-	-
"	"	180 min Perfusion	-	-	-	1
"	"	240 min Perfusion	-	1	-	1
"	Parallelkreislauf	Perfusionsbeginn	1	2	-	7
"	"	60 min Perfusion	4	-	-	2
"	"	120 min Perfusion	2	-	1	2
"	"	180 min Perfusion	-	-	1	2
"	"	240 min Perfusion	-	-	-	2

Tabelle 4: Versuch 2 ohne Tetracyclin: Keimzahlbestimmung

Die Gesamtkeimzahl der Stammlösungen, des Rinderцитratblutes und des Perfusionsmediums (zu verschiedenen Zeitpunkten und an verschiedenen Stellen der Kreisläufe entnommen) wurde mittels des Agargußplattenverfahrens ermittelt. Bis zum Beginn der Perfusion zirkulierte das Medium 120 min in der Apparatur.

Untersuchte Flüssigkeit	Entnahmestelle	Entnahmezeit	Keimzahl/ml
Stammlösung I	Zubereitungsgefäß	Zirkulationsbeginn	990
Stammlösung II	Aufbewahrungsgefäß	Zirkulationsbeginn	1 000
Rinderцитratblut	Aufbewahrungsgefäß	Zirkulationsbeginn	18 000
Perfusionsmedium	Zubereitungsgefäß	Zirkulationsbeginn	11 000
"	Perfusionskreislauf	Perfusionsbeginn	
"	a) Katheter		20 000
"	b) Vorratsgefäß		8 000
"	Vor dem Rattenhirn	60 min Perfusion	16 000
"	"	120 min Perfusion	24 000
"	"	180 min Perfusion	138 000
"	"	240 min Perfusion	480 000
"	Hinter dem Rattenhirn	60 min Perfusion	14 000
"	"	120 min Perfusion	24 000
"	"	180 min Perfusion	140 000
"	"	240 min Perfusion	500 000
"	Parallelkreislauf	Perfusionsbeginn	5 900
"	"	60 min Perfusion	8 300
"	"	120 min Perfusion	11 000
"	"	180 min Perfusion	17 000
"	"	240 min Perfusion	39 000

Tabelle 5: Versuch 2 ohne Tetracyclin: Keimartenbestimmung

Jeweils 10 Keime (den Stammlösungen, dem Rinderцитratblut und dem Perfusionsmedium zu verschiedenen Zeitpunkten und an verschiedenen Stellen der Kreisläufe entnommen) wurden nach Tabelle 1 differenziert.

Keimreservoir	Entnahmestelle	Entnahmezeit	pseudo- Koli- monaden forme	sonst. gramneg. Stäbchen	grampos. Kokken	grampos. Stäbchen
Stammlösung I	Zubereitungsgefäß	Zirkulationsbeginn	-	-	10	-
Stammlösung II	Zubereitungsgefäß	Zirkulationsbeginn	1	-	8	-
Rinderцитratblut	Gefäß	Zirkulationsbeginn	-	1	4	5
Perfusionsmedium	Zubereitungsgefäß	Zirkulationsbeginn	-	-	8	2
"	Vor dem Rattenhirn	Perfusionsbeginn	-	-	2	8
"	"	60 min Perfusion	1	-	1	7
"	"	120 min Perfusion	-	-	2	8
"	"	180 min Perfusion	-	-	-	9
"	"	240 min Perfusion	-	-	-	8
"	Hinter dem Rattenhirn	60 min Perfusion	-	3	-	7
"	"	120 min Perfusion	-	-	-	8
"	"	180 min Perfusion	-	-	2	8
"	"	240 min Perfusion	1	1	1	6
"	Parallelkreislauf	Perfusionsbeginn	1	1	7	-
"	"	60 min Perfusion	-	-	7	3
"	"	120 min Perfusion	-	-	1	9
"	"	180 min Perfusion	-	-	3	7
"	"	240 min Perfusion	-	4	-	6

Tabelle 6: Versuch 5 ohne Tetracyclin: Keimzahlbestimmung

Die Gesamtkeimzahl der Stammlösungen, des Rincercitratblutes und des Perfusionsmediums (zu verschiedenen Zeitpunkten und an verschiedenen Stellen der Kreisläufe entnommen) wurde mittels des Agargußplattenverfahrens ermittelt. Bis zum Beginn der Perfusion zirkulierte das Medium 45 min in der Apparatur.

Untersuchte Flüssigkeit	Entnahmestelle	Entnahmezeit	Keimzahl/ml
Stammlösung I	Zubereitungsgefäß	Zirkulationsbeginn	710
Stammlösung II	Aufbewahrungsgefäß	Zirkulationsbeginn	840
Rincercitratblut	Aufbewahrungsgefäß	Zirkulationsbeginn	9 200
Perfusionsmedium	Zubereitungsgefäß	Zirkulationsbeginn	3 400
"	Perfusionskreislauf	Perfusionsbeginn	9 600
"	Vor dem Rattenhirn	60 min Perfusion	14 000
"	"	120 min Perfusion	39 000
"	"	180 min Perfusion	93 000
"	"	240 min Perfusion	450 000
"	Hinter dem Rattenhirn	60 min Perfusion	12 000
"	"	120 min Perfusion	41 000
"	"	180 min Perfusion	87 000
"	"	240 min Perfusion	420 000
"	Parallelkreislauf	Perfusionsbeginn	6 000
"	"	60 min Perfusion	8 600
"	"	120 min Perfusion	29 000
"	"	180 min Perfusion	40 000
"	"	240 min Perfusion	110 000

Tabelle 7: Versuch 5 ohne Tetracyclin: Keimartenbestimmung

Jeweils 10 Keime (den Stammlösungen, dem Rindercitratblut und dem Perfusionsmedium zu verschiedenen Zeitpunkten und an verschiedenen Stellen der Kreisläufe entnommen) wurden nach dem Schema der Tabelle 1 differenziert.

Keimreservoir	Entnahmestelle	Entnahmezeit	Pseudo- monaden	Koli- forme Stäbchen	gramneg. grampos.	sonst. Stäbchen	grampos. Stäbchen
Stammlösung I	Zubereitungsgefäß	Zirkulationsbeginn	-	1	-	9	-
Stammlösung II	Zubereitungsgefäß	Zirkulationsbeginn	1	-	1	4	4
Rindercitratblut Gefäß		Zirkulationsbeginn	-	3	1	6	-
Perfusionsmedium	Zubereitungsgefäß	Zirkulationsbeginn	1	-	-	-	9
"	Vor dem Rattenhirn	Perfusionsbeginn	1	-	-	1	8
"	"	60 min Perfusion	1	1	-	-	8
"	"	120 min Perfusion	-	-	1	-	9
"	"	180 min Perfusion	-	-	-	-	10
"	"	240 min Perfusion	-	-	3	-	7
"	Hinter dem Rattenhirn	60 min Perfusion	-	-	-	1	9
"	"	120 min Perfusion	-	-	1	-	9
"	"	180 min Perfusion	1	-	2	-	7
"	"	240 min Perfusion	-	-	1	-	9
"	Parallelkreislauf	Perfusionsbeginn	-	-	-	2	8
"	"	60 min Perfusion	-	-	2	3	5
"	"	120 min Perfusion	-	-	2	-	8
"	"	180 min Perfusion	-	-	2	-	8
"	"	240 min Perfusion	-	-	-	-	10

teil unter den isolierten Keimen im Verlauf der Perfusionzeit recht konstant blieb (Tab. 7). Als Ursache ist anzunehmen, daß sich die mit der Stammlösung II eingebrachten grampositiven Stäbchen rascher vermehren konnten als die gleichzeitig anwesenden Kokken.

Versuch 3 ohne Antibiotikazusatz zum Perfusionsmedium

Zwischen Beginn der Zirkulation des Mediums in der Perfusionsapparatur und Beginn der Rattenhirnperfusion (d. h. innerhalb von 60 min) stieg die Gesamtkeimzahl von 5 600 Keimen/ml ungewöhnlich hoch auf 170 000 Keime/ml bei Entnahme der Probe aus dem Perfusionskreislauf bzw. 160 000 Keime/ml bei Entnahme der Probe aus dem Parallelkreislauf an. Nach 60 min zeigte sich jedoch die gleiche Keimzahlzunahme wie bei den übrigen Versuchen. Das spricht für eine stärkere Ausgangskeimzahl bei sonst üblichem Verhalten. Wahrscheinlich beruht der Bestimmungsfehler bei Zirkulationsbeginn auf einer Hitzeschädigung der Keime durch nicht vorschriftsmäßig abgekühlten Agar.

Trotz der Ähnlichkeit in der Zunahme der Gesamtkeimzahl im Verlauf der Perfusionzeit unterschieden sich die zu den einzelnen Beobachtungszeitpunkten willkürlich isolierten Keimarten bei Entnahme der Proben aus dem Perfusions- und Parallelkreislauf erheblich (Tab. 9). Zu Beginn der Zirkulation des Mediums in der Perfusionsapparatur wurden aus dem Perfusionsmedium überwiegend grampositive Stäbchen isoliert. Grampositive Stäbchen wurden auch mit hohem relativen Anteil neben grampositiven Kokken in den Stammlösungen nachgewiesen. Im Rindervollblut befanden sich hingegen vermehrt gram-

Tabelle 8: Versuch 3 ohne Tetracyclin: Keimzahlbestimmung

Die Gesamtkeimzahl der Stammlösungen, des Rindercitratblutes und des Perfusionsmediums (zu verschiedenen Zeitpunkten und an verschiedenen Stellen der Kreisläufe entnommen) wurde mittels des Agarfußplattenverfahrens ermittelt. Bis zum Beginn der Perfusion zirkulierte das Medium 60 min in der Apparatur.

Untersuchte Flüssigkeit	Entnahmestelle	Entnahmezeit	Keimzahl/ml
Stammlösung I	Zubereitungsgefäß	Zirkulationsbeginn	450
Stammlösung II	Aufbewahrungsgefäß	Zirkulationsbeginn	520
Rindercitratblut	Aufbewahrungsgefäß	Zirkulationsbeginn	48 000
Perfusionsmedium	Zubereitungsgefäß	Zirkulationsbeginn	5 600
"	Perfusionskreislauf	Perfusionsbeginn	170 000
"	Vor dem Rattenhirn	60 min Perfusion	240 000
"	"	120 min Perfusion	380 000
"	"	180 min Perfusion	930 000
"	"	240 min Perfusion	2 200 000
"	Hinter dem Rattenhirn	60 min Perfusion	240 000
"	"	120 min Perfusion	360 000
"	"	180 min Perfusion	650 000
"	"	240 min Perfusion	3 200 000
"	Parallelkreislauf	Perfusionsbeginn	160 000
"	"	60 min Perfusion	220 000
"	"	120 min Perfusion	480 000
"	"	180 min Perfusion	840 000
"	"	240 min Perfusion	3 200 000

Abelle 9: Versuch 3 ohne Tetracyclin: Keimartenbestimmung

eweiis 10 Keime (den Stammlösungen, dem Rinderцитratblut und dem Perfusionsmedium zu verschiedenen Zeitpunkten und an verschiedenen Stellen der Kreisläufe entnommen) wurden nach Tabelle 1 differenziert.

Keimreservoir	Entnahmestelle	Entnahmezeit	Pseudo- Koli- monaden	Koli- forme Stäbchen	gramneg. Kokken	grampos. Stäbchen	sonst.
Stammlösung I	Zubereitungsgefäß	Zirkulationsbeginn	0	0	0	5	5
Stammlösung II	Zubereitungsgefäß	Zirkulationsbeginn	0	0	1	2	7
Rinderцитratblut	Gefäß	Zirkulationsbeginn	0	0	1	9	0
Perfusionsmedium	Zubereitungsgefäß	Zirkulationsbeginn	0	0	0	2	8
	Vor dem Rattenhirn	Perfusionsbeginn	0	2	4	2	2
	"	60 min Perfusion	1	2	3	2	2
	"	120 min Perfusion	0	0	2	0	8
	"	180 min Perfusion	0	0	0	0	10
	"	240 min Perfusion	0	0	3	1	6
	Hinter dem Rattenhirn	60 min Perfusion	0	0	4	0	6
	"	120 min Perfusion	0	1	1	0	8
	"	180 min Perfusion	0	0	1	0	9
	"	240 min Perfusion	0	0	4	0	6
	Parallelkreislauf	Perfusionsbeginn	2	3	2	1	2
	"	60 min Perfusion	1	6	0	1	2
	"	120 min Perfusion	0	6	2	0	2
	"	180 min Perfusion	0	9	0	0	1
	"	240 min Perfusion	0	9	0	0	1

positive Kokken. Bei Entnahme der Proben vor dem isoliert perfundierten Rattenhirn nahm der relative Anteil der grampositiven Stäbchen bei Perfusionsbeginn zunächst ab, stieg aber nach 120 min Perfusion wieder an. Bei Entnahme der Proben hinter dem isoliert perfundierten Rattenhirn fanden sich dagegen schon nach 60 min Perfusion überwiegend grampositive Stäbchen. Ganz anders war das Verhalten der Keimarten im Parallelkreislauf. Dort erfolgte ein rascheres Wachstum der koliformen Bakterien, deren relativer Anteil schon nach 60 min Perfusion überwog.

Versuch 4 ohne Antibiotikazusatz zum Perfusionsmedium

Auch im Versuch 4 lag die Gesamtkeimzahl/ml Medium zu Beginn der Zirkulation in der Perfusionsapparatur zwischen den Keimzahlen der Stammlösungen und des Rinderцитratbluts. Bis zu einer Perfusionsdauer von 60 min erfolgte die Zunahme der Keimzahlen an den 3 Entnahmestellen in ähnlicher Weise (Tab. 10). Danach stiegen die Keimzahlen im Parallelkreislauf stärker an als im Perfusionskreislauf. Dem entsprach, daß im Parallelkreislauf der relative Anteil der Koliformen stärker zunahm als in zeitlich vergleichbaren Proben vor dem isoliert perfundierten Rattenhirn (Tab. 11). Hingegen verringerte sich mit der Perfusionszeit der Anteil der grampositiven Kokken, die sich vor allem in den Stammlösungen und im Rinderblut fanden.

Versuch 6 ohne Antibiotikazusatz zum Perfusionsmedium

Die Gesamtkeimzahlen der Stammlösungen, des Rinderцитratbluts und folglich auch des Perfusionsmediums zu Beginn

Tabelle 10: Versuch 4 ohne Tetracyclin: Keimzahlbestimmung

Die Gesamtkeimzahl der Stammlösungen, des Rindercitratblutes und des Perfusionsmediums (zu verschiedenen Zeitpunkten und an verschiedenen Stellen der Kreisläufe entnommen) wurde mittels des Agargußplattenverfahrens ermittelt. Bis zum Beginn der Perfusion zirkulierte das Medium 115 min in der Apparatur.

Untersuchte Flüssigkeit	Entnahmestelle	Entnahmezeit	Keimzahl/ml
Stammlösung I	Zubereitungsgefäß	Zirkulationsbeginn	250
Stammlösung II	Aufbewahrungsgefäß	Zirkulationsbeginn	840
Rindercitratblut	Aufbewahrungsgefäß	Zirkulationsbeginn	9 200
Perfusionsmedium	Zubereitungsgefäß	Zirkulationsbeginn	5 100
"	Perfusionskreislauf	Perfusionsbeginn	20 000
"	Vor dem Rattenhirn	60 min Perfusion	31 000
"	"	120 min Perfusion	40 000
"	"	180 min Perfusion	48 000
"	"	240 min Perfusion	210 000
"	Hinter dem Rattenhirn	60 min Perfusion	27 000
"	"	120 min Perfusion	38 000
"	"	180 min Perfusion	46 000
"	"	240 min Perfusion	230 000
"	Parallelkreislauf	Perfusionsbeginn	19 000
"	"	60 min Perfusion	29 000
"	"	120 min Perfusion	100 000
"	"	180 min Perfusion	220 000
"	"	240 min Perfusion	1 100 000

abelle 11: Versuch 4 ohne Tetracyclin: Keimartenbestimmung

eweils 10 Keime (den Stammlösungen, dem Rindercitratblut und dem Perfusionsmedium zu verschiedenen eitpunkten und an verschiedenen Stellen der Kreisläufe entnommen) wurden nach Tabelle 1 differenziert.

eimreservoir	Entnahmestelle	Entnahmezeit	sonst.		
			Pseudo- monaden	Koli- forme Stäbchen	gramneg. Stäbchen
tammlösung I	Zubereitungsgefäß	Zirkulationsbeginn	1	0	1
tammlösung II	Zubereitungsgefäß	Zirkulationsbeginn	1	0	4
indercitratblut Gefäß		Zirkulationsbeginn	0	2	0
erfusionsmedium	Zubereitungsgefäß	Zirkulationsbeginn	2	1	1
	Vor dem Rattenhirn	Perfusionsbeginn	0	5	0
	"	60 min Perfusion	4	3	2
	"	120 min Perfusion	2	7	0
	"	180 min Perfusion	2	7	1
	"	240 min Perfusion	0	7	1
	Hinter dem Rattenhirn	60 min Perfusion	2	6	0
	"	120 min Perfusion	0	9	1
	"	180 min Perfusion	0	9	1
	"	240 min Perfusion	1	7	2
	Parallelkreislauf	Perfusionsbeginn	3	5	0
	"	60 min Perfusion	1	8	1
	"	120 min Perfusion	0	10	0
	"	180 min Perfusion	0	9	0
	"	240 min Perfusion	0	10	0

Tabelle 12: Versuch 6 ohne Tetracyclin: Keimzahlbestimmung

Die Gesamtkeimzahl der Stammlösungen, des Rinderцитratblutes und des Perfusionsmediums (zu verschiedenen Zeitpunkten und an verschiedenen Stellen der Kreisläufe entnommen) wurde mittels des Agargußplattenverfahrens ermittelt. Bis zum Beginn der Perfusion zirkulierte das Medium 50 min in der Apparatur.

Untersuchte	Flüssigkeit	Entnahmestelle	Entnahmezeit	Keimzahl/ml
Stammlösung I	Zubereitungsgefäß	Zirkulationsbeginn		24 000
Stammlösung II	Aufbewahrungsgefäß	Zirkulationsbeginn		9 600
Rinderцитratblut	Aufbewahrungsgefäß	Zirkulationsbeginn		160 000
Perfusionsmedium	Zubereitungsgefäß	Zirkulationsbeginn		23 000
"	Perfusionskreislauf	Perfusionsbeginn		39 000
"	Vor dem Rattenhirn	60 min Perfusion		76 000
"	"	120 min Perfusion		150 000
"	"	180 min Perfusion		270 000
"	"	240 min Perfusion		1 000 000
"	Hinter dem Rattenhirn	60 min Perfusion		81 000
"	"	120 min Perfusion		160 000
"	"	180 min Perfusion		270 000
"	"	240 min Perfusion		600 000
"	Parallelkreislauf	Perfusionsbeginn		37 000
"	"	60 min Perfusion		81 000
"	"	120 min Perfusion		140 000
"	"	180 min Perfusion		220 000
"	"	240 min Perfusion		430 000

Tabelle 13: Versuch 6 ohne Tetracyclin: Keimartenbestimmung

Jeweils 10 Keime (den Stammlösungen, dem Rindercitratblut und dem Perfusionsmedium zu verschiedenen Zeitpunkten und an verschiedenen Stellen der Kreisläufe entnommen) wurden nach dem Schema der Tabelle 1 differenziert.

Keimreservoir	Entnahmestelle	Entnahmezeit	Pseudo- monaden	Koli- formen	sonst. gramneg. Stäbchen	grampos. Stäbchen
Stammlösung I	Zubereitungsgefäß	Zirkulationsbeginn	10	-	-	-
Stammlösung II	Zubereitungsgefäß	Zirkulationsbeginn	10	-	-	-
Rindercitratblut	Zubereitungsgefäß	Zirkulationsbeginn	3	4	-	1
Perfusionsmedium	Zubereitungsgefäß	Zirkulationsbeginn	8	2	-	-
"	Vor dem Rattenhirn	Perfusionsbeginn	8	2	-	-
"	"	60 min Perfusion	3	1	5	1
"	"	120 min Perfusion	4	1	-	5
"	"	180 min Perfusion	3	1	-	6
"	"	240 min Perfusion	1	2	1	6
"	Hinter dem Rattenhirn	60 min Perfusion	6	3	1	-
"	"	120 min Perfusion	4	3	3	-
"	"	180 min Perfusion	1	4	1	4
"	"	240 min Perfusion	1	6	-	3
"	Parallelkreislauf	Perfusionsbeginn	-	6	-	4
"	"	60 min Perfusion	1	5	-	4
"	"	120 min Perfusion	1	5	2	2
"	"	180 min Perfusion	1	3	1	5
"	"	240 min Perfusion	1	-	2	7

der Zirkulation lagen höher als in den vorangegangenen Versuchen. Bis zu einer Perfusionszeit von 180 min stiegen die Keimzahlen in den Medien beider Kreisläufe in vergleichbarer Weise an (Tab. 12). Nach 240 min Perfusion divergierten die Keimzahlen stärker.

In den Stammlösungen wurden nur Pseudomonaden nachgewiesen. Auch im Perfusionsmedium waren zu Beginn der Zirkulation in der Apparatur 8 von 10 Keimen Pseudomonaden. Da auch die Keimzahlen der Stammlösung I und des fertigen Perfusionsmediums in der gleichen Größenordnung lagen, kann vermutet werden, daß der größte Teil der bakteriellen Verunreinigung durch die Stammlösung eingebracht wurde. Mit der Perfusionszeit nahm der relative Anteil der Pseudomonaden stark ab, der Anteil der grampositiven Stäbchen hingegen stark zu (Tab. 13). Unterschiedlich war das Verhalten der Koliformen. Vor dem isoliert perfundierten Rattenhirn blieb der relative Anteil der koliformen Bakterien mit 1 - 2 Keimen während der Versuchszeit recht konstant. Hinter dem Rattenhirn war eine relative Zunahme der Koliformen von 3 Keimen nach 60 min Perfusion auf 6 Keime nach 240 min Perfusion zu verzeichnen. Bei Entnahme der Proben aus dem Parallelkreislauf zeigte sich nach anfänglicher Zunahme gegenüber dem Wert zu Beginn der Zirkulation von 2 Keimen auf 6 zu Beginn der Perfusion eine relative Abnahme der Koliformen.

Versuch 7 ohne Antibiotikazusatz zum Perfusionsmedium

Der Keimzahlenanstieg während der Perfusionszeit erfolgte im Parallelkreislauf wie in den Versuchen 1, 2 und 5

Tabelle 14: Versuch 7 ohne Tetracyclin: Keimzahlbestimmung

Die Gesamtkeimzahl der Stammlösungen, des Rinderцитratblutes und des Perfusionsmediums (zu verschiedenen Zeitpunkten und an verschiedenen Stellen der Kreisläufe entnommen) wurde mittels des Agargusplattenverfahrens ermittelt. Bis zum Beginn der Perfusion zirkulierte das Medium 40 min in der Apparatur.

Untersuchte	Flüssigkeit	Entnahmestelle	Entnahmezeit	Keimzahl/ml
Stammlösung I		Zubereitungsgefäß	Zirkulationsbeginn	2 300
Stammlösung II		Aufbewahrungsgefäß	Zirkulationsbeginn	1 900
Rinderцитratblut		Aufbewahrungsgefäß	Zirkulationsbeginn	98 000
Perfusionsmedium		Zubereitungsgefäß	Zirkulationsbeginn	9 200
"		Perfusionskreislauf	Perfusionsbeginn	20 000
"		Vor dem Rattenhirn	60 min Perfusion	28 000
"		"	120 min Perfusion	34 000
"		"	180 min Perfusion	200 000
"		"	240 min Perfusion	630 000
"		Hinter dem Rattenhirn	60 min Perfusion	21 000
"		"	120 min Perfusion	26 000
"		"	180 min Perfusion	120 000
"		"	240 min Perfusion	440 000
"		Parallelkreislauf	Perfusionsbeginn	9 600
"		"	60 min Perfusion	15 000
"		"	120 min Perfusion	17 000
"		"	180 min Perfusion	24 000
"		"	240 min Perfusion	39 000

Tabelle 15: Versuch 7 ohne Tetracyclin: Keimartenbestimmung

Jeweils 10 Keime (den Stammlösungen, dem Rindercitratblut und dem Perfusionsmedium zu verschiedenen Zeitpunkten und an verschiedenen Stellen der Kreisläufe entnommen) wurden nach dem Schema der Tabelle 1 differenziert.

Keimreservoir	Entnahmestelle	Entnahmezeit	sonst.			
			Pseudo- monaden	Koli- forme Stäbchen	gramneg. Kokken	grampos. Stäbchen
Stammlösung I	Zubereitungsgefäß	Zirkulationsbeginn	5	1	-	4
Stammlösung II	Zubereitungsgefäß	Zirkulationsbeginn	6	1	-	3
Rindercitratblut	Gefäß	Zirkulationsbeginn	1	-	-	7
Perfusionsmedium	Zubereitungsgefäß	Zirkulationsbeginn	2	-	4	3
"	Vor dem Rattenhirn	Perfusionsbeginn	5	3	1	1
"	"	60 min Perfusion	4	2	3	1
"	"	120 min Perfusion	5	1	2	2
"	"	180 min Perfusion	7	3	-	-
"	"	240 min Perfusion	3	4	1	2
"	Hinter dem Rattenhirn	60 min Perfusion	9	1	-	-
"	"	120 min Perfusion	2	4	2	-
"	"	180 min Perfusion	1	3	5	1
"	"	240 min Perfusion	3	4	2	1
"	Parallelkreislauf	Perfusionsbeginn	7	-	2	1
"	"	60 min Perfusion	4	-	3	2
"	"	120 min Perfusion	1	2	5	2
"	"	180 min Perfusion	3	3	-	4
"	"	240 min Perfusion	1	5	1	2

Tabelle 16: Versuch 8 ohne Tetracyclin: Keimzahlbestimmung

Die Gesamtkeimzahl der Stammlösungen, des Rinderцитratblutes und des Perfusionsmediums (zu verschiedenen Zeitpunkten und an verschiedenen Stellen der Kreisläufe entnommen) wurde mittels des Agargusplattenverfahrens ermittelt. Bis zum Beginn der Perfusion zirkulierte das Medium 115 min in der Apparatur.

Untersuchte Flüssigkeit	Entnahmestelle	Entnahmezeit	Keimzahl/ml
Stammlösung I	Zubereitungsgefäß	Zirkulationsbeginn	580
Stammlösung II	Aufbewahrungsgefäß	Zirkulationsbeginn	520
Rinderцитratblut	Aufbewahrungsgefäß	Zirkulationsbeginn	28 000
Perfusionsmedium	Zubereitungsgefäß	Zirkulationsbeginn	13 000
"	Perfusionskreislauf	Perfusionsbeginn	17 000
"	Vor dem Rattenhirn	60 min Perfusion	27 000
"	"	120 min Perfusion	34 000
"	"	180 min Perfusion	44 000
"	"	240 min Perfusion	110 000
"	Hinter dem Rattenhirn	60 min Perfusion	24 000
"	"	120 min Perfusion	33 000
"	"	180 min Perfusion	43 000
"	"	240 min Perfusion	130 000
"	Parallelkreislauf	Perfusionsbeginn	16 000
"	"	60 min Perfusion	26 000
"	"	120 min Perfusion	32 000
"	"	180 min Perfusion	43 000
"	"	240 min Perfusion	170 000

Tabelle 17: Versuch 8 ohne Tetracyclin: Keimartenbestimmung

Jeweils 10 Keime (den Stammlösungen, dem Rinderцитratblut und dem Perfusionsmedium zu verschiedenen Zeitpunkten und an verschiedenen Stellen der Kreisläufe entnommen) wurden nach dem Schema der Tabelle 1 differenziert.

Keimreservoir	Entnahmestelle	Entnahmezeit	sonst.				
			Pseudo- monaden	Koli- forme	gramneg. Stäbchen	grampos. Kokken	sonst. Stäbchen Keime
Stammlösung I	Zubereitungsgefäß	Zirkulationsbeginn	4	1	2	-	3
Stammlösung II	Zubereitungsgefäß	Zirkulationsbeginn	6	1	1	1	1
Rinderцитratblut	Gefäß	Zirkulationsbeginn	2	-	1	5	2
Perfusionsmedium	Zubereitungsgefäß	Zirkulationsbeginn	2	-	2	4	1
"	Vor dem Rattenhirn	Perfusionsbeginn	4	1	2	-	3
"	"	60 min Perfusion	3	-	5	2	-
"	"	120 min Perfusion	5	-	-	1	4
"	"	180 min Perfusion	3	1	1	3	1
"	"	240 min Perfusion	6	1	2	-	1
"	Hinter dem Rattenhirn	60 min Perfusion	9	-	1	-	-
"	"	120 min Perfusion	4	-	2	2	2
"	"	180 min Perfusion	5	2	1	1	1
"	"	240 min Perfusion	3	-	4	-	3
"	Parallelkreislauf	Perfusionsbeginn	4	1	2	3	-
"	"	60 min Perfusion	2	3	1	-	4
"	"	120 min Perfusion	2	4	2	1	1
"	"	180 min Perfusion	2	1	3	1	3
"	"	240 min Perfusion	4	1	3	-	2

wesentlich geringer als im Perfusionskreislauf. Auch hinter dem Rattenhirn nahm die Keimzahl etwas geringer zu als vor dem Rattenhirn (Tab. 14).

In den Stammlösungen wurden überwiegend Pseudomonaden nachgewiesen, deren Anteil im Perfusionsmedium zu Beginn der Zirkulation in der Perfusionsapparatur nicht so groß war (Tab. 15). Nach anfänglicher Zunahme nahm der Anteil der Pseudomonaden mit der Perfusionsdauer an allen drei Entnahmestellen zugunsten der schneller wachsenden Koliformen ab. Im Parallelkreislauf erfolgte die Zunahme der Koliformen später, was dem geringeren Anstieg der Keimzahl in diesem System entspricht.

Versuch 8 ohne Antibiotikazusatz zum Perfusionsmedium

Die Gesamtkeimzahl/ml Perfusionsmedium lag zu Beginn der Zirkulation in der Perfusionsapparatur wie in den vorangegangenen Versuchen zwischen den Keimzahlen der Stammlösungen und des Rindercitratbluts. Die Keimzahlen stiegen zwischen den Beobachtungszeitpunkten sowohl vor und hinter dem isoliert perfundierten Rattenhirn als auch im Parallelkreislauf in ähnlicher Weise an (Tab. 16).

In den Stammlösungen befanden sich unter den untersuchten Keimen überwiegend Pseudomonaden. Aber es wurden auch Koliforme, sonstige gramnegative Stäbchen, grampositive Kokken und grampositive Stäbchen nachgewiesen. Im Rindercitratblut überwog neben den anderen Keimen der relative Anteil der grampositiven Kokken, deren Anteil auch im Perfusionsmedium zu Beginn der Zirkulation in der Perfusionsapparatur groß war. Die bei Zirkulationsbeginn festgestellte Keimartenverteilung blieb während des ganzen Versuchs im großen und ganzen erhalten (Tab. 17).

3.1.2. Resistenzbestimmung

Im Gegensatz zu der Darstellung der Keimzahl und Keimartenbestimmung können wegen der Fülle der Einzel-
daten die Ergebnisse der Resistenzbestimmung nicht für
jeden Versuch einzeln beschrieben werden. In den
Tabellen 18 und 19 ist deshalb nur die durchschnitt-
liche Häufigkeit sensibler Keime von den jeweils 10
getesteten, willkürlich isolierten Mikroorganismen
angegeben. Als statistische Maßzahl für die indivi-
duellen Unterschiede zwischen den Einzelversuchen
wurde die Spannweite $x_{\max} - x_{\min}$ hinzugefügt. Diese ist
definiert als die Differenz zwischen Maximum und Mini-
mum über den in allen 8 Perfusionsversuchen ermittelten
Häufigkeiten sensibler Keime. Die Antibiotika wurden in
der Reihenfolge ihrer Wirksamkeit aufgeführt, wie sie
sich aus Tabelle 21 ergibt. Nur die 6 wirksamsten Anti-
biotika nach Tabelle 21 sollen hier näher besprochen
werden.

Tetracyclin (50 µg/Blättchen): Gegen Tetracyclin (50 µg)
waren in der Stammlösung I durchschnittlich 9,3 Keime,
in der Stammlösung II, im Rindercitratblut und im Per-
fusionsmedium bei Zirkulationsbeginn jeweils 9,8 Keime
sensibel. Während der Perfusionszeit blieb die durch-
schnittliche Häufigkeit sensibler Keime an allen 3 Ent-
nahmestellen nahezu konstant.

Chloramphenicol (50 µg/Blättchen): Gegen Chloramphenicol
waren in der Stammlösung I durchschnittlich 8,3 Keime,
in der Stammlösung II 9,4, im Rindercitratblut 9,5 und
Perfusionsmedium zu Zirkulationsbeginn 9,8 Keime sen-
sibel. Mit der Perfusionszeit nahm zunächst die durch-
schnittliche Häufigkeit der sensiblen Keime an allen

Tabelle 18: Durchschnittliche Häufigkeit sensibler Keime in Stammlösung I und II und im Rindercitratblut für die Perfusionsversuche ohne Tetracyclin.

Von jeweils 10 Keimen (der Stammlösung I und II und dem Rindercitratblut zu Beginn der Zirkulation entnommen) wurde die Sensibilität gegen die aufgeführten antibakteriellen Substanzen (Dosis/Blättchen in Klammern) mittels des Papierblättchen-Agardiffusionsverfahrens bestimmt. Jedem der angegebenen Mittelwerte $\bar{x}$ ist als weitere statistische Maßzahl die Spannweite $x_{\max} - x_{\min}$ hinzugefügt. Diese ist definiert als die Differenz zwischen Maximum und Minimum über die in allen 8 Perfusionsversuchen ermittelten Häufigkeiten sensibler Keime.

Tabelle 18:

Antibakterielle Substanz	Häufigkeit sensibler Keime in					
	Stammlösung I			Stammlösung II		
	$\bar{x}$	$x_{\max}$	$-x_{\min}$	$\bar{x}$	$x_{\max}$	$-x_{\min}$
Tetracyclin (50 µg)	9,3	3		9,8	2	9,8
Chloramphenicol (50 µg)	8,3	5		9,4	3	9,5
Gentamycin (10 µg)	8,3	10		7,9	9	9,1
Polymyxin B (300 E)	7,1	9		6,8	8	9,4
Tetracyclin (10 µg)	8,3	6		8,7	6	9,0
Neomycin (10 µg)	7,9	10		7,0	9	8,4
Nalidixinsäure (30 µg)	5,6	6		7,0	4	4,9
Chloramphenicol (10 µg)	2,5	6		2,9	10	8,6
Carbenicillin (100 µg)	7,3	6		7,1	8	8,3
Erythromycin (10 µg)	8,3	6		8,3	7	7,6
Nitrofurantoin (200 µg)	5,0	9		5,1	10	5,1
Sulfadiazin (50 µg)	6,0	10		5,0	10	7,1
Ampicillin (25 µg)	7,0	6		6,5	10	8,0
Trimethoprim/Sulfamethoxazol (25 µg)	7,0	7		6,0	7	7,0
Cephaloridin (5 µg)	6,0	10		5,1	10	5,8
Penicillin (1,5 E)	3,6	9		3,4	10	4,1
Cloxacillin (5 µg)	4,9	9		4,0	8	4,6

Tabellen 19 a - f:

Durchschnittliche Häufigkeit sensibler Keime im Perfusionsmedium ohne Tetracyclin.

Von jeweils 10 Keimen (dem Perfusionsmedium zu verschiedenen Zeitpunkten und an verschiedenen Stellen der Kreisläufe entnommen) wurde die Sensibilität gegen die aufgeführten antibakteriellen Substanzen (Dosis/Blättchen in Klammern) mittels des Papierblättchen-Agardiffusionsverfahrens bestimmt. Jedem der angegebenen Mittelwerte ist als weitere statistische Maßzahl die Spannweite $x_{\max} - x_{\min}$ hinzugefügt. Diese ist definiert als die Differenz zwischen Maximum und Minimum über die in allen 8 Perfusionsversuchen ermittelten Häufigkeiten sensibler Keime.

Tabelle 19 a:

Entnahmestelle	Entnahmezeit	Tetracyclin (50 µg)			Chloramphenicol (50 µg)			Gentamycin (10 µg)		
		$\bar{x}$	$x_{\max}$	$-x_{\min}$	$\bar{x}$	$x_{\max}$	$-x_{\min}$	$\bar{x}$	$x_{\max}$	$-x_{\min}$
Zubereitungsgefäß	Zirkulationsbeginn	9,8	2		9,8	2		8,8	5	
Perfusionskreislauf	Perfusionsbeginn	9,5	1		9,4	2		9,5	4	
Vor dem Rattenhirn	60 min Perfusion	9,8	1		9,3	4		9,3	5	
"	120 min Perfusion	10,0	0		9,6	1		9,4	2	
"	180 min Perfusion	10,0	0		9,3	4		9,6	2	
"	240 min Perfusion	9,9	1		9,8	1		9,6	2	
Hinter dem Rattenhirn	60 min Perfusion	9,5	3		9,1	2		9,3	5	
"	120 min Perfusion	9,9	1		9,6	2		9,5	2	
"	180 min Perfusion	9,5	2		9,5	1		9,8	1	
"	240 min Perfusion	9,8	1		9,8	2		9,8	1	
Parallelkreislauf	Perfusionsbeginn	10,0	0		9,0	3		8,5	3	
"	60 min Perfusion	9,6	1		9,4	2		9,3	3	
"	120 min Perfusion	10,0	0		9,5	2		9,6	2	
"	180 min Perfusion	9,9	1		9,8	2		9,6	1	
"	240 min Perfusion	9,9	1		10,0	0		9,9	1	

Tabelle 19 b:

Entnahmestelle	Entnahmezeit	Polymyxin B (300 E)		Tetracyclin (10 µg)		Neomycin (10 µg)	
		$\bar{x}$	$x_{\max} - x_{\min}$	$\bar{x}$	$x_{\max} - x_{\min}$	$\bar{x}$	$x_{\max} - x_{\min}$
Zubereitungsgefäß	Zirkulationsbeginn	8,4	6	8,3	7	8,5	6
Perfusionskreislauf	Perfusionsbeginn	9,6	3	8,5	4	8,9	6
Vor dem Rattenhirn	60 min Perfusion	9,6	1	9,0	3	9,1	3
"	120 min Perfusion	9,3	1	9,8	1	9,3	3
"	180 min Perfusion	9,4	3	9,3	3	9,4	2
"	240 min Perfusion	9,4	2	9,5	3	9,9	1
Hinter dem Rattenhirn	60 min Perfusion	9,9	1	9,1	4	9,4	3
"	120 min Perfusion	9,5	3	9,5	2	9,4	2
"	180 min Perfusion	9,6	1	9,5	2	9,5	2
"	240 min Perfusion	9,4	2	9,1	3	9,9	2
Parallelkreislauf	Perfusionsbeginn	8,8	6	8,1	3	7,8	6
"	60 min Perfusion	9,3	2	9,3	2	8,0	4
"	120 min Perfusion	9,5	2	9,5	2	9,0	2
"	180 min Perfusion	9,8	2	9,4	3	8,8	5
"	240 min Perfusion	9,9	1	9,6	1	9,4	2

Tabelle 19 c:

Nalidixinsäure Chloramphenicol Carbenicillin						
Entnahmestelle	Entnahmezeit	(300 µg)		(100 µg)		(100 µg)
		$\bar{x}$	$x_{\max} - x_{\min}$	$\bar{x}$	$x_{\max} - x_{\min}$	$\bar{x}$
Zubereitungsgefäß	Zirkulationsbeginn	6,4	9	5,9	6	8,0
Perfusionskreislauf	Perfusionsbeginn	8,1	4	6,3	6	6,6
Vor dem Rattenhirn	60 min Perfusion	7,4	4	6,6	6	6,5
"	120 min Perfusion	7,3	4	7,9	4	7,3
"	180 min Perfusion	8,0	5	7,3	6	7,8
"	240 min Perfusion	8,1	6	7,4	6	7,8
Hinter dem Rattenhirn	60 min Perfusion	7,0	9	6,3	6	6,8
"	120 min Perfusion	7,5	5	7,1	6	7,1
"	180 min Perfusion	8,3	4	8,4	4	7,6
"	240 min Perfusion	8,3	4	7,0	8	7,6
Parallelkreislauf	Perfusionsbeginn	5,4	7	6,3	8	6,0
"	60 min Perfusion	6,6	7	7,1	6	6,6
"	120 min Perfusion	7,4	4	8,0	4	6,8
"	180 min Perfusion	7,1	5	8,8	3	7,5
"	240 min Perfusion	8,0	8	9,5	1	7,0

Tabelle 19 d:

Entnahmestelle	Entnahmezeit	Erythromycin (10 µg)		Nitrofurantoin (200 µg)		Sulfadiazin (50 µg)	
		$\bar{x}$	$x_{\max} - x_{\min}$	$\bar{x}$	$x_{\max} - x_{\min}$	$\bar{x}$	$x_{\max} - x_{\min}$
Zubereitungsgefäß	Zirkulationsbeginn	8,5	5	5,9	9	7,0	10
Perfusionskreislauf	Perfusionsbeginn	6,1	9	5,0	8	5,0	9
Vor dem Rattenhirn	60 min Perfusion	6,6	8	5,4	4	5,6	7
"	120 min Perfusion	7,0	4	5,6	5	6,5	9
"	180 min Perfusion	7,3	7	6,1	8	6,6	7
"	240 min Perfusion	7,5	7	6,8	5	6,5	8
Hinter dem Rattenhirn	60 min Perfusion	5,8	8	5,4	4	5,1	8
"	120 min Perfusion	6,8	8	5,5	5	5,9	8
"	180 min Perfusion	7,0	9	7,3	6	7,0	10
"	240 min Perfusion	6,9	7	6,4	8	7,4	8
Parallelkreislauf	Perfusionsbeginn	6,4	8	5,1	9	5,3	8
"	60 min Perfusion	6,5	7	6,4	6	5,3	7
"	120 min Perfusion	5,8	8	6,8	7	5,4	10
"	180 min Perfusion	6,0	9	7,9	4	4,3	7
"	240 min Perfusion	5,5	9	8,5	4	5,1	8

Tabelle 19 e:

Entnahmestelle	Entnahmezeit	Ampicillin (25 µg)		Trimethoprim/ Sulfamethoxazol Cephaloridin (25 µg)		(5 µg)	
		$\bar{x}$	$x_{\max}^{-x}_{\min}$	$\bar{x}$	$x_{\max}^{-x}_{\min}$	$\bar{x}$	$x_{\max}^{-x}_{\min}$
Zubereitungsgefäß	Zirkulationsbeginn	7,9	7	7,0	4	7,0	10
Perfusionskreislauf	Perfusionsbeginn	5,4	7	4,8	7	4,1	8
Vor dem Rattenhirn	60 min Perfusion	5,0	6	4,6	7	3,4	4
"	120 min Perfusion	5,5	10	4,9	7	3,5	7
"	180 min Perfusion	5,9	10	5,5	7	4,4	8
"	240 min Perfusion	5,4	7	5,8	8	4,9	7
Hinter dem Rattenhirn	60 min Perfusion	4,4	9	4,8	8	3,4	7
"	120 min Perfusion	4,6	7	4,80	7	3,5	8
"	180 min Perfusion	6,4	9	6,4	6	5,6	9
"	240 min Perfusion	5,8	9	5,5	5	4,6	10
Parallelkreislauf	Perfusionsbeginn	5,5	7	4,8	8	4,4	8
"	60 min Perfusion	4,4	9	4,8	9	3,8	10
"	120 min Perfusion	4,1	9	5,3	5	3,1	7
"	180 min Perfusion	5,0	9	5,5	7	4,0	9
"	240 min Perfusion	4,4	8	5,0	9	3,1	10

Tabelle 19 f:

Entnahmestelle	Entnahmezeit	Penicillin (1,5 E)		Cloxacillin (5 µg)	
		$\bar{x}$	$x_{\max} - x_{\min}$	$\bar{x}$	$x_{\max} - x_{\min}$
Zubereitungsgefäß	Zirkulationsbeginn	5,0	8	5,5	10
Perfusionskreislauf	Perfusionsbeginn	1,6	4	1,9	5
Vor dem Rattenhirn	60 min Perfusion	1,3	2	1,5	2
"	120 min Perfusion	2,3	5	1,1	4
"	180 min Perfusion	2,7	6	2,3	5
"	240 min Perfusion	3,3	5	2,0	3
Hinter dem Rattenhirn	60 min Perfusion	2,1	6	1,6	5
"	120 min Perfusion	2,3	6	2,3	6
"	180 min Perfusion	3,8	8	3,4	6
"	240 min Perfusion	3,0	6	2,1	6
Parallelkreislauf	Perfusionsbeginn	2,6	8	3,3	8
"	60 min Perfusion	2,5	10	2,3	10
"	120 min Perfusion	1,5	6	1,4	6
"	180 min Perfusion	2,4	6	2,4	5
"	240 min Perfusion	1,8	6	1,1	3

drei Entnahmestellen geringfügig ab. Nach 240 min Perfusion waren jedoch wieder durchschnittlich 9,8 Keime (vor und hinter dem Rattenhirn) bzw. 10,0 Keime (im Parallelkreislauf) gegen Chloramphenicol empfindlich.

Gentamycin (10 µg/Blättchen), Polymyxin B (300 E/Blättchen), Tetracyclin (10 µg/Blättchen) und Neomycin (10 µg/Blättchen): Gegen diese vier Antibiotika zeigten die untersuchten Keime des Perfusionsmediums ein ähnliches Verhalten. Zu Beginn der Zirkulation in der Apparatur waren deutlich weniger Keime gegen Gentamycin, Polymyxin B, Tetracyclin (10 µg) und Neomycin sensibel als gegen Tetracyclin (50 µg) und Chloramphenicol (50 µg). Mit der Perfusionsdauer nahm jedoch die Zahl der empfindlichen Keime zu und erreichte ähnliche Werte wie bei den zuerst beschriebenen Antibiotika.

Alle anderen getesteten Antibiotika und Chemotherapeutika hemmten pro Beobachtungszeit und Probeentnahmeort im Mittel weniger als 9 der jeweils 10 untersuchten Keime im Wachstum (mit Ausnahme von Chloramphenicol 10 µg nach 240 min Perfusion im Parallelkreislauf). Mit der Perfusionszeit nahm im allgemeinen die Zahl der sensiblen Keime gegen Nalidixinsäure, Chloramphenicol (10 µg), Nitrofurantoin und Erythromycin zu. Ab nahm hingegen die Zahl der sensiblen Keime gegen Ampicillin, Cephaloridin, Penicillin und Cloxacillin.

3.1.3. Überblick über die Versuche ohne Antibiotikazusatz

In den 8 Proben der Stammlösung I wurden 250 bis 24.000 Keime/ml gefunden. Die Keimzahlen in der Stammlösung II

lagen zwischen 460 und 9.600 Keime/ml. Während das Rinderцитratblut 9.200 bis 160.000 Keime/ml enthielt. Die Keimzahlen im Perfusionsmedium zu Beginn der Zirkulation lagen im allgemeinen zwischen den Werten der Stammlösungen und denen des Rinderцитratblutes.

Während der 8 Versuche ohne Tetracyclinzusatz wurde mit fortschreitender Perfusionszeit im allgemeinen ein Keimzahlanstieg beobachtet. In den Einzelversuchen zeigten sich schon zu Beginn der Zirkulation des Mediums in der Perfusionsapparatur relativ große Unterschiede bezüglich der eingebrachten bakteriellen Verunreinigung. Diese Schwankungen verstärkten sich mit der Perfusionsdauer. Trotzdem zeigte sich stets eine ähnliche Charakteristik im Keimzahlanstieg. Die Abbildung 2 zeigt den durchschnittlichen Keimzahlanstieg in Abhängigkeit von der Perfusionszeit. Gleichzeitig sind die in den Einzelversuchen ermittelten Keimzahlwerte angegeben. Vor und hinter dem Rattenhirn traten in den Einzelversuchen nur geringe Keimzahlunterschiede auf, die im Bereich der methodischen Fehlergrenze lagen. Im Parallelkreislauf erfolgte der durchschnittliche Keimzahlanstieg in ähnlicher Weise wie im Perfusionskreislauf. Dennoch wurden in einigen Versuchen größere Differenzen in der Keimzahlzunahme im Perfusions- und Parallelkreislauf beobachtet, was aus der Ausbildung einer unterschiedlichen Bakterienflora in den beiden, sonst identischen Medien erklärt werden könnte.

Zusammen mit dem Keimzahlanstieg schien eine Veränderung des Keimartenspektrums stattzufinden (Tabelle 20). Der durchschnittliche Anteil der grampositiven Kokken unter

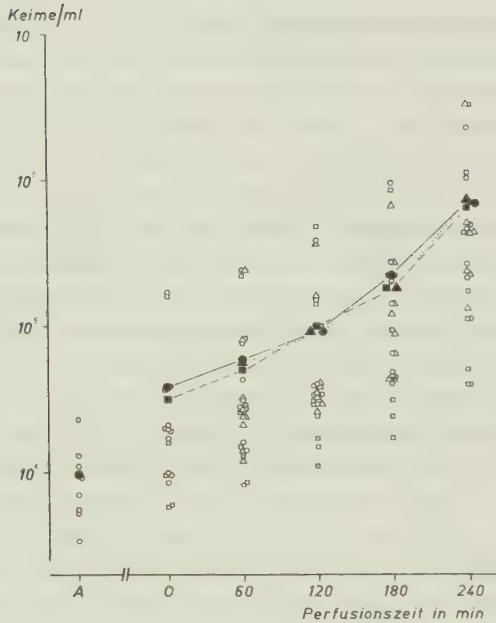


Abbildung 2: Keimzahl im Perfusionsmedium des isolierten Rattenhirns ohne Tetracyclin.

Bestimmt wurde die Keimzahl pro ml Medium (Ordinate) mit dem Agargußplattenverfahren in Abhängigkeit von der Perfusionszeit (Abszisse). Es wurden 8 Einzelversuche durchgeführt.

A Zeitpunkt des Zirkulationsbeginns. Bis zum Beginn der Perfusion zirkulierte das Medium 40 bis 120 min in der Apparatur.

- Durchschnittliche Keimzahl vor dem Rattenhirn.
 - ▲····▲ Durchschnittliche Keimzahl hinter dem Rattenhirn.
 - Durchschnittliche Keimzahl im Parallelkreislauf.
- Die offenen Symbole geben die Einzelwerte an.

Tabelle 20: Durchschnittliche Häufigkeit differenzierter Keime im Perfusionsmedium ohne Tetracyclin.

Jeweils 10 Keime (den Perfusionsmedien zu verschiedenen Zeitpunkten und an verschiedenen Stellen der Kreisläufe entnommen) wurden nach dem Schema der Tabelle 1 differenziert.

A Zeitpunkt des Zirkulationsbeginns. Bis zum Beginn der Perfusion zirkulierte das Medium 40 - 120 min in der Apparatur.

Keimarten	Durchschnittliche Häufigkeit differenzierter Keime					
	Perfusionszeit in min					
	A	0	60	120	180	240
Pseudomonaden	1,9	2,3	2,3	1,3	1,2	1,0
Koliforme	0,4	2,1	1,9	2,3	2,3	2,8
Sonstige gramnegative Stäbchen	1,3	0,8	1,4	1,3	0,8	1,3
Grampositive Kokken	3,1	1,9	1,0	0,5	0,5	0,3
Grampositive Stäbchen	3,2	2,9	3,5	4,7	5,0	4,5
Sonstige Keime	0,1	-	-	-	-	-

Tabelle 21: Häufigkeit sensibler Keime im Perfusionsmedium ohne Tetracyclin.

Isolierung von insgesamt 1 200 Keimen bei den Perfusionsversuchen ohne Tetracyclin. Sensibilität gegen die genannten Pharmaka (Dosis/Blättchen in Klammern) mittels des Papierblättchen-Agardiffusionsverfahrens getestet.

n = Zahl der sensiblen Keime von 1 200 untersuchten Bakterien

Antibakterielle Substanz	Häufigkeit sensibler Keime in	
	n	%
Tetracyclin (50 µg)	1 175	97,9
Chloramphenicol (50 µg)	1 141	95,1
Gentamycin (10 µg)	1 130	94,2
Polymyxin B (300 E)	1 129	94,1
Tetracyclin (10 µg)	1 099	91,6
Neomycin (10 µg)	1 088	90,7
Nalidixinsäure (30 µg)	886	73,8
Chloramphenicol (10 µg)	877	73,1
Carbenicillin (100 µg)	855	71,3
Erythromycin (10 µg)	796	66,3
Nitrofurantoin (200 µg)	751	62,6
Sulfadiazin (50 µg)	703	58,6
Ampicillin (25 µg)	635	52,9
Trimethoprim/Sulfamethoxazol (25 µg)	633	52,8
Cephaloridin (5 µg)	502	41,8
Penicillin (1,5 E)	303	25,3
Cloxacillin (5 µg)	270	22,5

den jeweils 10 untersuchten Keimen schien mit der Perfusionszeit abzunehmen, der durchschnittliche Anteil der koliformen Bakterien und der grampositiven Stäbchen zuzunehmen. Annähernd gleich jedoch blieb während der Beobachtungsdauer die durchschnittliche Häufigkeit der ermittelten Pseudomonaden und der sonstigen gramnegativen Stäbchen.

Im Papierblättchen-Agardiffusionsverfahren erwiesen sich folgende antibakterielle Substanzen gegen die aus den Medien isolierten Keime als die wirksamsten (siehe Tabelle 21):

Tetracyclin (50 µg und 10 µg/Blättchen), Chloramphenicol (50 µg/Blättchen), Gentamycin (10 µg/Blättchen), Polymyxin B (300 E/Blättchen) und Neomycin (10 µg/Blättchen).

3.2. Ergebnisse der 5 Versuche mit Zusatz von 1,0 mg% Tetracyclin zum Perfusionsmedium

3.2.1. Ergebnisse der Keimzahlbestimmung

Zusätzlich zu den in Abschnitt 3.1. durchgeführten Bestimmungen wurde während der Perfusionsversuche mit Tetracyclinzusatz auch die Keimzahlen im Erythrozytenkonzentrat nach dem letzten Zentrifugieren untersucht (Ausnahme Versuch 2). Während des Versuchs 1 wurde im Erythrozytenkonzentrat eine höhere Keimzahl als im Rinder-citratblut bestimmt. Hingegen lag in den Perfusionsversuchen 3 - 5 die Gesamtkeimzahl im Erythrozytenkonzentrat deutlich niedriger als im Rinder-citratblut. Das bedeutet, daß der Keimgehalt im wesentlichen an das Plasma gebunden ist und durch das Zentrifugieren zum Teil eliminiert wird.

Tabelle 22: Versuch 1 mit 1,0 mg% Tetracyclin: Keimzahlbestimmung

Die Gesamtkeimzahl der Stammlösungen, des Rinderblutes und des Perfusionsmediums (zu verschiedenen Zeitpunkten und an verschiedenen Stellen der Kreisläufe entnommen) wurde mittels des Agarplattenvorfahrens ermittelt. Bis zum Beginn der Perfusion zirkulierte das Medium 50 min in der Apparatur.

Untersuchte Flüssigkeit	Entnahmestelle	Entnahmezeit	Keimzahl/ml
Stammlösung I	Zubereitungsgefäß	Zirkulationsbeginn	9 200
Stammlösung II	Aufbewahrungsgefäß	Zirkulationsbeginn	4 800
Rindercitratblut	Aufbewahrungsgefäß	Zirkulationsbeginn	4 200
Erythrozytenkonzentrat	Zentrifugenglas	Zirkulationsbeginn	17 000
Perfusionsmedium	Zubereitungsgefäß	Zirkulationsbeginn	16 000
"	Perfusionskreislauf	Perfusionsbeginn	14 000
"	Vor dem Rattenhirn	60 min Perfusion	7 400
"	"	120 min Perfusion	5 600
"	"	180 min Perfusion	3 500
"	"	240 min Perfusion	7 800
"	Hinter dem Rattenhirn	60 min Perfusion	8 000
"	"	120 min Perfusion	9 800
"	"	180 min Perfusion	3 800
"	"	240 min Perfusion	11 000

Tabelle 23: Versuch 2 mit 1,0 mg% Tetracyclin: Keimzahlbestimmung

Die Gesamtkeimzahl der Stammlösungen, des Rinderblutes und des Perfusionsmediums (zu verschiedenen Zeitpunkten und an verschiedenen Stellen der Kreisläufe entnommen) wurde mittels des Agargußplattenverfahrens ermittelt. Bis zum Beginn der Perfusion zirkulierte das Medium 50 min in der Apparatur.

Untersuchte Flüssigkeit	Entnahmestelle	Entnahmezeit	Keimzahl/ml
Stammlösung I	Zubereitungsgefäß	Zirkulationsbeginn	5 100
Stammlösung II	Aufbewahrungsgefäß	Zirkulationsbeginn	9 400
Rindercitratblut	Aufbewahrungsgefäß	Zirkulationsbeginn	10 000
Erythrozytenkonzentrat	nicht untersucht		
Perfusionsmedium	Zubereitungsgefäß	Zirkulationsbeginn	14 000
"	Perfusionskreislauf	Perfusionsbeginn	15 000
"	Vor dem Rattenhirn	60 min Perfusion	6 400
"	"	120 min Perfusion	3 400
"	"	180 min Perfusion	3 000
"	"	240 min Perfusion	4 100
"	Hinter dem Rattenhirn	60 min Perfusion	4 300
"	"	120 min Perfusion	2 500
"	"	180 min Perfusion	4 700
"	"	240 min Perfusion	4 000

Tabelle 24: Versuch 3 mit 1,0 mg% Tetracyclin: Keimzahlbestimmung

Die Gesamtkeimzahl der Stammlösungen, des Rinderblutes und des Perfusionsmediums (zu verschiedenen Zeitpunkten und an verschiedenen Stellen der Kreisläufe entnommen) wurde mittels des Agargußplattenverfahrens ermittelt. Bis zum Beginn der Perfusion zirkulierte das Medium 45 min in der Apparatur.

Untersuchte Flüssigkeit	Entnahmestelle	Entnahmezeit	Keimzahl/ml
Stammlösung I	Zubereitungsgefäß	Zirkulationsbeginn	33 000
Stammlösung II	Aufbewahrungsgefäß	Zirkulationsbeginn	48 000
Rindercitratblut	Aufbewahrungsgefäß	Zirkulationsbeginn	620 000
Erythrozytenkonzentrat	Zentrifugenglas	Zirkulationsbeginn	130 000
Perfusionsmedium	Zubereitungsgefäß	Zirkulationsbeginn	110 000
"	Perfusionskreislauf	Perfusionsbeginn	92 000
"	Vor dem Rattenhirn	60 min Perfusion	31 000
"	"	120 min Perfusion	18 000
"	"	180 min Perfusion	9 800
"	"	240 min Perfusion	2 600
"	Hinter dem Rattenhirn	60 min Perfusion	33 000
"	"	120 min Perfusion	14 000
"	"	180 min Perfusion	10 000
"	"	240 min Perfusion	3 000

Tabelle 25: Versuch 4 mit 1,0 mg% Tetracyclin: Keimzahlbestimmung

Die Gesamtkeimzahl der Stammlösungen, des Rinderblutes und des Perfusionsmediums (zu verschiedenen Zeitpunkten und an verschiedenen Stellen der Kreisläufe entnommen) wurde mittels des Agargusplattenverfahrens ermittelt. Bis zum Beginn der Perfusion zirkulierte das Medium 30 min in der Apparatur.

Untersuchte Flüssigkeit	Entnahmestelle	Entnahmezeit	Keimzahl/ml
Stammlösung I	Zubereitungsgefäß	Zirkulationsbeginn	5 900
Stammlösung II	Aufbewahrungsgefäß	Zirkulationsbeginn	7 100
Rinderцитratblut	Aufbewahrungsgefäß	Zirkulationsbeginn	130 000
Erythrozytenkonzentrat	Zentrifugenglas	Zirkulationsbeginn	12 000
Perfusionsmedium	Zubereitungsgefäß	Zirkulationsbeginn	9 600
"	Perfusionskreislauf	Perfusionsbeginn	9 100
"	Vor dem Rattenhirn	60 min Perfusion	8 700
"	"	120 min Perfusion	6 200
"	"	180 min Perfusion	4 600
"	"	240 min Perfusion	2 300
"	Hinter dem Rattenhirn	60 min Perfusion	8 900
"	"	120 min Perfusion	6 900
"	"	180 min Perfusion	4 400
"	"	240 min Perfusion	3 300

Tabelle 26: Versuch 5 mit 1,0 mg% Tetracyclin: Keimzahlbestimmung

Die Gesamtkeimzahl der Stammlösungen, des Rinderblutes und des Perfusionsmediums (zu verschiedenen Zeitpunkten und an verschiedenen Stellen der Kreisläufe entnommen) wurde mittels des Agargußplattenverfahrens ermittelt. Bis zum Beginn der Perfusion zirkulierte das Medium 40 min in der Apparatur.

Untersuchte Flüssigkeit	Entnahmestelle	Entnahmezeit	Keimzahl/ml
Stammlösung I	Zubereitungsgefäß	Zirkulationsbeginn	9 700
Stammlösung II	Aufbewahrungsgefäß	Zirkulationsbeginn	13 000
Rindercitratblut	Aufbewahrungsgefäß	Zirkulationsbeginn	3 000 000
Erythrozytenkonzentrat	Zentrifugenglas	Zirkulationsbeginn	17 000
Perfusionsmedium	Zubereitungsgefäß	Zirkulationsbeginn	19 000
"	Perfusionskreislauf	Perfusionsbeginn	16 000
"	Vor dem Rattenhirn	60 min Perfusion	12 000
"	"	120 min Perfusion	5 700
"	"	180 min Perfusion	3 900
"	"	240 min Perfusion	4 300
"	Hinter dem Rattenhirn	60 min Perfusion	14 000
"	"	120 min Perfusion	5 500
"	"	180 min Perfusion	3 600
"	"	240 min Perfusion	4 300

Die Gesamtkeimzahl des Perfusionsmediums lag zu Beginn der Zirkulation in der Perfusionsapparatur während der Versuche 1, 3 und 5 zwischen den Werten der Keimzahlen des Erythrozytenkonzentrats und den Werten der Keimzahlen, die von den Proben der Stammlösungen ermittelt wurden. Im Versuch 5 war die Keimzahl zu Beginn der Zirkulation in der Perfusionsapparatur höher als die des Erythrozytenkonzentrats (und der Stammlösungen), im Versuch 2 höher als die des Rindercitratbluts (Erythrozytenkonzentrat wurde nicht untersucht).

Im Verlauf der Perfusionszeit nahm die Gesamtkeimzahl des Perfusionsmediums in allen 5 Versuchen erwartungsgemäß zwischen den Beobachtungszeitpunkten ab. Nur während des Versuchs 1 stieg die Keimzahl zwischen 180 und 240 min Perfusion bei Entnahme der Proben vor und hinter dem isoliert perfundierten Rattenhirn an, erreichte aber nicht den Ausgangswert zu Beginn der Zirkulation in der Perfusionsapparatur (Tabelle 23). Auch während des Versuchs 2 stieg die Keimzahl zwischen 180 und 240 min Perfusion bei Entnahme der Probe vor dem Rattenhirn und zwischen 120 und 180 min Perfusion hinter dem Rattenhirn leicht an. Während des Versuchs 3 wurde eine hohe Ausgangskeimzahl beobachtet, die während der Perfusionszeit gleichförmig abnahm und schließlich Werte wie in den anderen Versuchen erreichte.

3.2.2. Ergebnisse der Keimartenbestimmung

Zur Einsparung von Kosten und Arbeitszeit wurde auf die

Isolierung und Differenzierung der Keime des nach Rattenhirnpassage gewonnenen Mediums verzichtet. Desgleichen wurden die Stammlösungen, das Rinderцитratblut und das Erythrozytenkonzentrat nicht mehr untersucht. Isoliert und differenziert wurden lediglich Keime der Proben des Mediums, die zu Beginn der Zirkulation und Perfusion und vor dem Rattenhirn gewonnen wurden. Die Ergebnisse zeigt die Tabelle 27.

Versuch 1 mit 1,0 mg% Tetracyclin

Zu Beginn der Zirkulation des Mediums in der Perfusionsapparatur befanden sich im Perfusionsmedium überwiegend Pseudomonaden. Mit der Perfusionszeit nahm der relative Anteil der Pseudomonaden ab. Der relative Anteil der Koliformen stieg hingegen bis zu einer Perfusionszeit von 180 min stark an und fiel dann aber wieder ab. Am Ende der Perfusionszeit wurden von den untersuchten Keimen 4 als sonstige gramnegative Stäbchen identifiziert. Diese Keimartenverschiebung fiel mit einem deutlichen Keimzahlanstieg zusammen (Tab. 22).

Versuch 2 mit 1,0 mg% Tetracyclin

Der Anteil der Pseudomonaden überwog auch in diesem Versuch zu Beginn der Zirkulation des Mediums. Mit der Perfusionszeit nahm er stark ab. Der relative Anteil der Koliformen blieb von Beginn der Perfusion (zu Beginn der Zirkulation wurden keine Koliformen nachgewiesen) bis zu einer Perfusionszeit von 240 min recht konstant. Der relative Anteil der sonstigen gramnegativen Stäbchen nahm während der Perfusion im allgemeinen zu. Nach 240 min Perfusion wurden auch 4 grampositive Stäbchen nachgewiesen. Auch diese Keimartenverschiebung fiel mit

Tabelle 27: Versuche mit 1,0 mg% Tetracyclin: Keimartenbestimmung

Es wurden 5 Perfusionsversuche mit Zusatz von 1,0 mg% Tetracyclin zum Perfusionsmedium durchgeführt. Jeweils 10 Keime (dem Perfusionsmedium zu Beginn der Zirkulation aus dem Zubereitungsgefäß und während der Perfusion zu verschiedenen Zeitpunkten vor dem isoliert perfundierten Rattenhirn entnommen) wurden nach dem Schema der Tabelle 1 differenziert.

Perfusionsversuch		Entnahmezeit	Pseudo- monaden	Koli- forme	sonst. gramneg. Stäbchen	grampos. Kokken	grampos. Stäbchen
Versuch 1	Zirkulationsbeginn		9	1	-	-	-
	Perfusionsbeginn		6	3	1	-	-
	60 min Perfusion		6	3	1	-	-
	120 min Perfusion		6	3	1	-	-
	180 min Perfusion		3	7	-	-	-
	240 min Perfusion		4	2	4	-	-
Versuch 2	Zirkulationsbeginn		7	-	2	-	1
	Perfusionsbeginn		4	2	4	-	-
	60 min Perfusion		3	3	4	-	-
	120 min Perfusion		1	2	6	-	1
	180 min Perfusion		2	2	5	-	1
	240 min Perfusion		-	2	3	1	4

Tabelle 27 (Fortsetzung):

Versuch	Perfusionsversuch	Entnahmezeit	Pseudo- monaden	Koli- forme	sonst.		
					gramneg. Stäbchen	grampos. Kokken	grampos. Stäbchen
Versuch 3		Zirkulationsbeginn	4	4	-	-	2
		Perfusionsbeginn	4	5	1	-	-
		60 min Perfusion	4	2	-	-	4
		120 min Perfusion	6	-	2	-	2
		180 min Perfusion	5	-	2	-	3
		240 min Perfusion	5	1	-	-	4
Versuch 4		Zirkulationsbeginn	8	1	-	-	1
		Perfusionsbeginn	8	-	1	-	1
		60 min Perfusion	10	-	-	-	-
		120 min Perfusion	10	-	-	-	-
		180 min Perfusion	9	-	-	-	1
		240 min Perfusion	5	-	1	3	1
Versuch 5		Zirkulationsbeginn	5	2	-	2	1
		Perfusionsbeginn	9	1	-	-	-
		60 min Perfusion	9	1	-	-	-
		120 min Perfusion	8	2	-	-	-
		180 min Perfusion	9	-	-	1	-
		240 min Perfusion	10	-	-	-	-

einem leichten Keimzahlanstieg vor dem Rattenhirn zusammen.

Versuch 3 mit 1,0 mg% Tetracyclin

Dieser Versuch unterschied sich von allen anderen durch eine hohe Ausgangskeimzahl, die während der Versuchsdauer gleichförmig abnahm und schließlich Werte erreichte, die mit den anderen Versuchen vergleichbar waren. Diesem besonderen Verlauf entsprach auch ein abweichendes Verhalten der Keimarten. Der relative Anteil der Pseudomonaden blieb während der Perfusion recht konstant. Der relative Anteil der Koliformen nahm hingegen mit der Perfusionszeit ab. Der Anteil der grampositiven Stäbchen nahm zunächst ab, stieg aber mit der Perfusionsdauer wieder an.

Versuch 4 mit 1,0 mg% Tetracyclin

Auch während dieses Versuches befanden sich unter den 10 differenzierten Keimen zu Beginn der Zirkulation des Mediums in der Perfusionsapparatur überwiegend Pseudomonaden, deren relativer Anteil bis zu einer Perfusionszeit von 180 min recht konstant blieb. Nach 240 min Perfusion wurden hingegen weniger Pseudomonaden nachgewiesen. Der Nachweis von grampositiven Kokken am Ende der Perfusion war nicht mit einem Anstieg der Keimzahl verbunden.

Versuch 5 mit 1,0 mg% Tetracyclin

Im Gegensatz zu den vorangegangenen Versuchen nahm während des Versuchs 5 trotz gleichartigen Keimzahlverhaltens der relative Anteil der Pseudomonaden mit der Perfusionsdauer stark zu.

3.2.3. Ergebnisse der Resistenzbestimmung

Die Ergebnisse des Papierblättchen-Agardiffusionsverfahrens zur Prüfung der Sensibilität der willkürlich isolierten Keime während der 5 Versuche mit Zusatz von 1 mg% Tetracyclin zum Perfusionsmedium sind in den Tabellen 28 und 30 zusammengefaßt. Bei der Beschreibung beschränken wir uns auf die 5 Antibiotika, die in Abschnitt 3.1.2. die günstigsten Resultate zeigten.

Tetracyclin (50 µg/Blättchen und 10 µg/Blättchen):
Zu Beginn der Zirkulation des Mediums waren alle Keime gegen Tetracyclin sensibel. Mit der Perfusionsdauer nahm die Empfindlichkeit gegen Tetracyclin (50 µg) leicht, gegen Tetracyclin (10 µg) etwas stärker ab. Dennoch hemmte Tetracyclin auch in diesen Versuchen insgesamt mehr Keime als die anderen Antibiotika (siehe Tabelle 31). Trotz der Zugabe von Tetracyclin zum Medium wurde also in der relativ kurzen Versuchszeit kein vermehrtes Wachstum resistenter Keime beobachtet. Dieses Verhalten der Keime geht mit der im allgemeinen beobachteten Keimzahlabnahme während der Perfusion einher.

Chloramphenicol (50 µg/Blättchen):
Gegen Chloramphenicol waren zu Beginn der Zirkulation deutlich weniger Keime sensibel als in den Vorversuchen ohne Tetracyclinzusatz. Während der Perfusion nahm die Zahl der empfindlichen Keime zu, erreichte aber nicht die günstigen Werte der Vorversuche.

Gentamycin (10 µg/Blättchen):
Gegen Gentamycin waren noch weniger Keime als gegen

Tabelle 28: Durchschnittliche Häufigkeit sensibler Keime im Perfusionsmedium
mit 1,0 mg% Tetracyclin.

Weitere Angaben siehe Legende zu Tabelle 19.

Entnahmestelle	Entnahmezeit	Tetracyclin (50 µg)		Tetracyclin (10 µg)		Chloramphenicol (50 µg)	
		$\bar{x}$	$x_{\max}^{-x_{\min}}$	$\bar{x}$	$x_{\max}^{-x_{\min}}$	$\bar{x}$	$x_{\max}^{-x_{\min}}$
Zubereitungsgefäß	Zirkulationsbeginn	10,0	0	10,0	0	7,2	6
Perfusionskreislauf	Perfusionsbeginn	9,6	2	9,2	4	6,4	8
Vor dem Rattenhirn	60 min Perfusion	9,6	2	8,8	2	7,8	7
"	120 min Perfusion	10,0	0	9,2	1	6,8	9
"	180 min Perfusion	9,8	1	9,4	2	8,6	7
"	240 min Perfusion	9,4	3	8,4	5	8,4	4

Tabelle 28 (Fortsetzung):

Entnahmestelle	Entnahmezeit	Polymycin B (300 E)		Gentamycin (10 µg)		Erythromycin (10 µg)	
		$\bar{x}$	$x_{\max} - x_{\min}$	$\bar{x}$	$x_{\max} - x_{\min}$	$\bar{x}$	$x_{\max} - x_{\min}$
Zubereitungsgefäß	Zirkulationsbeginn	6,4	8	5,6	5	5,0	5
Perfusionskreislauf	Perfusionsbeginn	8,2	6	7,8	3	4,2	5
Vor dem Rattenhirn	60 min Perfusion	6,8	5	6,0	5	5,4	8
"	120 min Perfusion	5,6	8	5,2	7	5,2	9
"	180 min Perfusion	5,6	9	6,0	8	7,0	6
"	240 min Perfusion	5,0	9	5,8	9	7,8	6

Tabelle 28 (Fortsetzung):

Entnahmestelle	Entnahmezeit	Neomycin (10 µg)		Chloramphenicol (10 µg)		Trimethoprim/ Sulfamethoxazol (25 µg)	
		$\bar{x}$	$x_{\max} - x_{\min}$	$\bar{x}$	$x_{\max} - x_{\min}$	$\bar{x}$	$x_{\max} - x_{\min}$
Zubereitungsgefäß	Zirkulationsbeginn	5,6	8	2,2	3	5,0	5
Perfusionskreislauf	Perfusionsbeginn	6,0	6	3,8	6	3,2	5
Vor dem Rattenhirn	60 min Perfusion	5,6	5	4,4	9	3,0	5
"	120 min Perfusion	4,4	8	4,2	8	3,6	7
"	180 min Perfusion	4,6	7	5,4	6	4,2	8
"	240 min Perfusion	4,8	8	4,4	8	3,4	8

Tabelle 28 (Fortsetzung):

Entnahmestelle	Entnahmezeit	Carbenicillin (100 µg)		Nalidixinsäure (30 µg)		Sulfadiazin (50 µg)	
		$\bar{x}$	$x_{\max} - x_{\min}$	$\bar{x}$	$x_{\max} - x_{\min}$	$\bar{x}$	$x_{\max} - x_{\min}$
Zubereitungsgefäß	Zirkulationsbeginn	3,6	8	3,8	7	1,8	3
Perfusionskreislauf	Perfusionsbeginn	4,2	6	3,8	7	2,2	3
Vor dem Rattenhirn	60 min Perfusion	2,8	5	3,6	8	3,0	4
"	120 min Perfusion	2,6	9	2,4	7	3,8	7
"	180 min Perfusion	4,0	9	4,0	7	4,0	8
"	240 min Perfusion	4,6	9	3,4	6	4,4	6

Tabelle 28 (Fortsetzung):

Entnahmestelle	Entnahmezeit	Ampicillin (25 µg)		Nitrofurantoin (200 µg)		Cephaloridin (5 µg)	
		$\bar{x}$	$x_{\max} - x_{\min}$	$\bar{x}$	$x_{\max} - x_{\min}$	$\bar{x}$	$x_{\max} - x_{\min}$
Zubereitungsgefäß	Zirkulationsbeginn	2,2	5	1,8	4	1,2	4
Perfusionskreislauf	Perfusionsbeginn	2,2	2	2,0	4	1,8	4
Vor dem Rattenhirn	60 min Perfusion	2,4	6	2,4	5	0,8	2
"	120 min Perfusion	2,0	5	1,6	4	1,6	4
"	180 min Perfusion	2,4	8	2,8	8	2,4	8
"	240 min Perfusion	2,8	9	3,0	6	2,4	6

Tabelle 28 (Fortsetzung):

Entnahmestelle	Entnahmezeit	Cloxacillin (5 µg)		Penicillin (1,5 E)	
		$\bar{x}$	$x_{\max} - x_{\min}$	$\bar{x}$	$x_{\max} - x_{\min}$
Zubereitungsgefäß	Zirkulationsbeginn	1,4	4	1,2	4
Perfusionskreislauf	Perfusionsbeginn	1,6	3	1,6	3
Vor dem Rattenhirn	60 min Perfusion	0,8	2	0,8	2
"	120 min Perfusion	1,4	4	1,2	3
"	180 min Perfusion	1,6	7	1,6	7
"	240 min Perfusion	2,2	8	2,2	8

Chloramphenicol zu Beginn der Zirkulation sensibel. Auch erfolgte im allgemeinen keine Zunahme der empfindlichen Keime während der Perfusion. Die durchschnittliche Häufigkeit sensibler Keime blieb hingegen recht konstant.

Polymyxin B (300 E/Blättchen):

Gegen Polymyxin B nahm hingegen während der Perfusion die Zahl der sensiblen Keime im allgemeinen ab. Wie bei Gentamycin und Chloramphenicol waren schon bei Beginn der Zirkulation deutlich weniger Keime gegen Polymyxin B empfindlich.

Neomycin (10 µg/Blättchen):

Gegen Neomycin zeigten die untersuchten Keime ein ähnliches Verhalten wie bei Polymyxin B beschrieben: Geringe Empfindlichkeit bei Beginn der Zirkulation und Abnahme derselben mit der Perfusionsdauer.

Bessere Ergebnisse als Neomycin ergab die Testung der Keime gegen Erythromycin (siehe Tabelle 30). Zu Beginn der Zirkulation waren zwar weniger Keime gegen Erythromycin empfindlich (Tabelle 28), mit der Perfusionsdauer nahm aber die Sensibilität der Mikroorganismen stark zu. Ein Anstieg der empfindlichen Keime wurde auch bei Chloramphenicol (10 µg), Carbenicillin, Sulfadiazin, Nitrofurantoin, Cephaloridin, Cloxacillin und Penicillin beobachtet. Gegen Trimethoprim/Sulfamethoxazol nahm hingegen die durchschnittliche Häufigkeit hemmbarer Keime mit der Perfusionsdauer ab. Annähernd gleich hingegen blieb die Zahl sensibler Keime gegen Nalidixinsäure und Ampicillin.

3.2.4. Überblick über die Versuche mit Zusatz von 1,0 mg% Tetracyclin

In den 5 Proben der Stammlösung I wurden 5.100 bis 33.000 Keime pro ml gefunden. Die Stammlösung II enthielt zwischen 4.800 und 48.000 Keime pro ml. Im Rindercitratblut befanden sich hingegen 4.500 bis 3.000.000 Keime pro ml. Im Erythrozytenkonzentrat wurden dagegen nur zwischen 12.000 und 130.000 Keime pro ml ermittelt.

Die Abbildung 3 zeigt das Verhalten der Keimzahlen während der Perfusionszeit. Die Ausgangskeimzahl zu Beginn der Zirkulation lag im allgemeinen höher als bei den Vorversuchen. Auch in diesen Versuchen zeigten sich relativ große Schwankungen bezüglich der eingebrachten bakteriellen Verunreinigung. Vor und hinter dem Rattenhirn traten in den Einzelversuchen nur geringe Keimzahlunterschiede auf, die im Bereich der methodischen Fehlergrenze lagen. Mit der Perfusionsdauer nahm im allgemeinen die Keimzahl ab.

Unter den jeweils 10 differenzierten Keimen befanden sich, verglichen mit den Kontrollversuchen ohne Tetracyclin, im Medium vermehrt Pseudomonaden. Mit der Perfusionsdauer nahm der relative Anteil der Pseudomonaden und der Koliformen im allgemeinen leicht ab. Hingegen erfolgte ein Anstieg der sonstigen gramnegativen Stäbchen und der grampositiven Stäbchen.

Analog dem veränderten Keimartenspektrum zeigte sich auch eine veränderte antibakterielle Empfindlichkeit der aus dem Medium isolierter Keime (Tabelle 30). Trotz des Tetracyclinzusatzes wurden auch die bei diesen Ver-

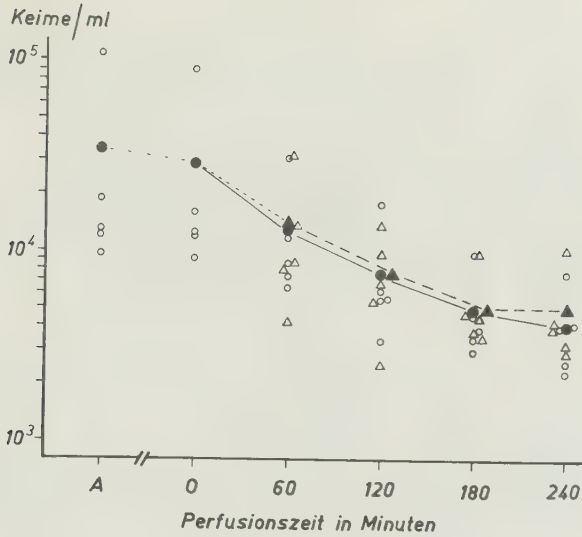


Abbildung 3: Keimzahl im Perfusionsmedium des isolierten Rattenhirns mit 1,0 mg% Tetracyclin.

Bestimmt wurde die Keimzahl pro ml Medium (Ordinate) mit dem Agargußplattenverfahren in Abhängigkeit von der Perfusionszeit (Abszisse). Es wurden 5 Einzelversuche durchgeführt.

A Zeitpunkt des Zirkulationsbeginns. Bis zum Beginn der Perfusion zirkulierte das Medium 30 bis 50 min in der Apparatur.

● — ● Durchschnittliche Keimzahl vor dem Rattenhirn.
▲ - - - ▲ Durchschnittliche Keimzahl hinter dem Rattenhirn.
Die offenen Symbole geben die Einzelwerte an.

Tabelle 29: Durchschnittliche Häufigkeit differenzierter Keime im Perfusionsmedium mit 1,0 mg% Tetracyclin.

Jeweils 10 Keime (den Perfusionsmedien zu verschiedenen Zeitpunkten und an verschiedenen Stellen der Kreisläufe entnommen) wurden nach dem Schema der Tabelle 1 differenziert.

A Zeitpunkt des Zirkulationsbeginns. Bis zum Beginn der Perfusion zirkulierte das Medium 30 bis 50 min in der Apparatur.

Keimarten	Durchschnittliche Häufigkeit differenzierter Keime					
	A	0	60	120	180	240
Pseudomonaden	6,6	6,0	6,4	6,2	5,6	4,8
Koliforme	2,0	2,2	1,8	1,4	1,8	1,0
Sonstige gramnegative Stäbchen	-	1,4	1,0	1,8	1,4	1,6
Grampositive Kokken	0,4	-	-	-	0,2	0,8
Grampositive Stäbchen	1,0	0,4	0,8	0,6	1,0	1,8
Sonstige Keime	-	-	-	-	-	-

Tabelle 30: Häufigkeit sensibler Keime im Perfusionsmedium mit 1,0 mg% Tetracyclin.

Isolierung von insgesamt 300 Keimen bei den Perfusionsversuchen mit 1,0 mg% Tetracyclin. Sensibilität gegen die genannten Pharmaka (Dosis/Blättchen in Klammern) mittels des Papierblättchen-Agardiffusionsverfahrens getestet.

n = Zahl der sensiblen Keime von 300 untersuchten Bakterien.

Antibakterielle Substanz	Häufigkeit sensibler Keime	
	n	%
Tetracyclin (50 µg)	292	97,3
Chloramphenicol (50 µg)	226	75,3
Gentamycin (10 µg)	182	60,8
Polymyxin B (300 E)	188	62,7
Tetracyclin (10 µg)	275	91,7
Neomycin (10 µg)	155	51,7
Nalidixinsäure (30 µg)	105	35,0
Chloramphenicol (10 µg)	122	40,7
Carbenicillin (100 µg)	109	36,3
Erythromycin (10 µg)	173	57,7
Nitrofurantoin (200 µg)	68	22,7
Sulfadiazin (50 µg)	96	32,0
Ampicillin (25 µg)	70	23,3
Trimethoprim/Sulfamethoxazol (25 µg)	112	37,3
Cephaloridin (5 µg)	51	17,0
Penicillin (1,5 E)	43	14,3
Cloxacillin (5 µg)	45	15,0

suchen isolierten Keime hauptsächlich durch Tetracyclin (50 µg und 10 µg) gehemmt. Der Effekt war eher noch ausgeprägter als bei den Keimen, die aus den antibiotikafreien Perfusionsmedien isoliert wurden. Gegen Chloramphenicol (50 µg), Gentamycin, Polymyxin B und Neomycin, die sich in den Versuchen ohne Tetracyclin als sehr wirksam erwiesen hatten, waren hingegen weniger Keime empfindlich.

3.3. Ergebnisse der 3 Versuche mit Zusatz von 0,5 mg% Tetracyclin zum Perfusionsmedium

3.3.1. Keimzahl- und Keimartenbestimmung

In den folgenden Versuchen sollte überprüft werden, ob auch durch eine geringere Tetracyclinkonzentration eine Zunahme der Keimzahl während einer Perfusionszeit von 4 h verhindert werden kann. Dem fertigen Perfusionsmedium wurde deshalb nur 0,5 mg% Tetracyclin zugesetzt.

In diesen 3 Versuchen fanden sich in der Stammlösung I 2.800 bis 4.300 Keime pro ml. Im Rindercitratblut wurden zwischen 76.000 und 370.000 Keime ermittelt. Weniger Keime als im Rindercitratblut fanden sich hingegen in allen 3 Versuchen im Erythrozytenkonzentrat (7.400 bis 20.000 Keime pro ml) (siehe Abschnitt 3.2.1.).

Die durchschnittliche Ausgangskeimzahl zu Beginn der Zirkulation lag in der Größenordnung, wie sie in den Vorversuchen ermittelt wurde (siehe Abbildung 5). Während der 3 Versuche nahm die Gesamtkeimzahl wie in den vorangegangenen Versuchen mit 1,0 mg% Tetracyclin im allgemeinen ab. Die Tabellen 31 bis 33 zeigen die in

Tabelle 31: Versuch 1 mit 0,5 mg% Tetracyclin: Keimzahlbestimmung

Die Gesamtkeimzahl der Stammlösungen, des Rinderblutes und des Perfusionsmediums (zu verschiedenen Zeitpunkten und an verschiedenen Stellen der Kreisläufe entnommen) wurde mittels des Agarplattenvorfahrens ermittelt. Bis zum Beginn der Perfusion zirkulierte das Medium 40 min in der Apparatur.

Untersuchte Flüssigkeit	Entnahmestelle	Entnahmezeit	Keimzahl/ml
Stammlösung I	Zubereitungsgefäß	Zirkulationsbeginn	4 300
Stammlösung II	Aufbewahrungsgefäß	Zirkulationsbeginn	3 000
Rindercitratblut	Aufbewahrungsgefäß	Zirkulationsbeginn	370 000
Erythrozytenkonzentrat	Zentrifugenglas	Zirkulationsbeginn	20 000
Perfusionsmedium	Zubereitungsgefäß	Zirkulationsbeginn	13 000
"	Perfusionskreislauf	Perfusionsbeginn	9 600
"	Vor dem Rattenhirn	60 min Perfusion	9 400
"	"	120 min Perfusion	8 600
"	"	180 min Perfusion	6 900
"	"	240 min Perfusion	3 900
"	Hinter dem Rattenhirn	60 min Perfusion	8 700
"	"	120 min Perfusion	8 200
"	"	180 min Perfusion	6 700
"	"	240 min Perfusion	3 700

Tabelle 32: Versuch 2 mit 0,5 mg% Tetracyclin: Keimzahlbestimmung

Die Gesamtkeimzahl der Stammlösungen, des Rinderblutes und des Perfusionsmediums (zu verschiedenen Zeitpunkten und an verschiedenen Stellen der Kreisläufe entnommen) wurde mittels des Agargußplattenverfahrens ermittelt. Bis zum Beginn der Perfusion zirkulierte das Medium 40 min in der Apparatur.

Untersuchte Flüssigkeit	Entnahmestelle	Entnahmezeit	Keimzahl/ml
Stammlösung I	Zubereitungsgefäß	Zirkulationsbeginn	3 500
Stammlösung II	Aufbewahrungsgefäß	Zirkulationsbeginn	5 000
Rindercitratblut	Aufbewahrungsgefäß	Zirkulationsbeginn	76 000
Erythrozytenkonzentrat	Zentrifugenglas	Zirkulationsbeginn	7 400
Perfusionsmedium	Zubereitungsgefäß	Zirkulationsbeginn	9 000
"	Perfusionskreislauf	Perfusionsbeginn	8 100
"	Vor dem Rattenhirn	60 min Perfusion	6 800
"	"	120 min Perfusion	6 200
"	"	180 min Perfusion	6 200
"	"	240 min Perfusion	4 600
"	Hinter dem Rattenhirn	60 min Perfusion	8 000
"	"	120 min Perfusion	6 800
"	"	180 min Perfusion	5 900
"	"	240 min Perfusion	4 000

Tabelle 33: Versuch 3 mit 0,5 mg% Tetracyclin: Keimzahlbestimmung

Die Gesamtkeimzahl der Stammlösungen, des Rinderblutes und des Perfusionsmediums (zu verschiedenen Zeitpunkten und an verschiedenen Stellen der Kreisläufe entnommen) wurde mittels des Agargußplattenverfahrens ermittelt. Bis zum Beginn der Perfusion zirkulierte das Medium 50 min in der Apparatur.

Untersuchte	Flüssigkeit	Entnahmestelle	Entnahmezeit	Keimzahl/ml
Stammlösung I		Zubereitungsgefäß	Zirkulationsbeginn	2 800
Stammlösung II		Aufbewahrungsgefäß	Zirkulationsbeginn	8 900
Rinderцитratblut		Aufbewahrungsgefäß	Zirkulationsbeginn	100 000
Erythrozytenkonzentrat		Zentrifugenglas	Zirkulationsbeginn	14 000
Perfusionsmedium		Zubereitungsgefäß	Zirkulationsbeginn	14 000
"		Perfusionskreislauf	Perfusionsbeginn	12 000
"		Vor dem Rattenhirn	60 min Perfusion	14 000
"		"	120 min Perfusion	8 100
"		"	180 min Perfusion	7 900
"		"	240 min Perfusion	7 200
"		Hinter dem Rattenhirn	60 min Perfusion	9 100
"		"	120 min Perfusion	8 200
"		"	180 min Perfusion	7 900
"		"	240 min Perfusion	6 700

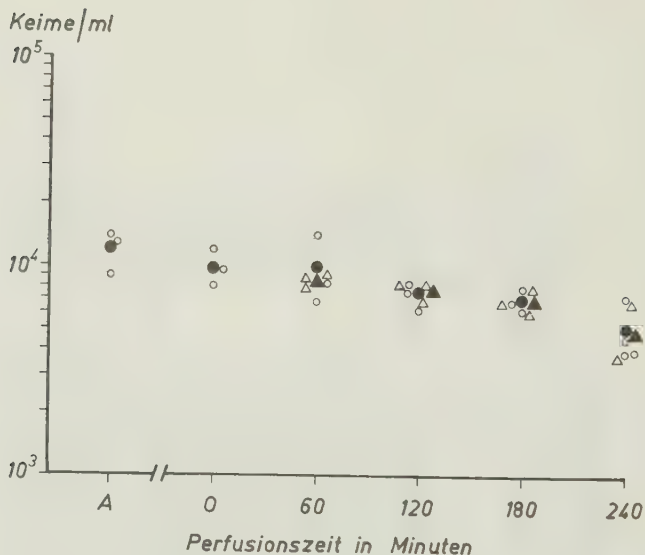


Abbildung 4: Keimzahl im Perfusionsmedium des isolierten Rattenhirns mit 0,5 mg% Tetracyclin.

Bestimmt wurde die Keimzahl pro ml Medium (Ordinate) mit dem Agargußplattenverfahren in Abhängigkeit von der Perfusionszeit (Abszisse). Es wurden 3 Einzelversuche durchgeführt.

A Zeitpunkt des Zirkulationsbeginns. Bis zum Beginn der Perfusion zirkulierte das Medium 30 bis 50 min in der Apparatur.

- — ● Durchschnittliche Keimzahl vor dem Rattenhirn.
 - ▲ — ▲ Durchschnittliche Keimzahl hinter dem Rattenhirn.
- Die offenen Symbole geben die Einzelwerte an.

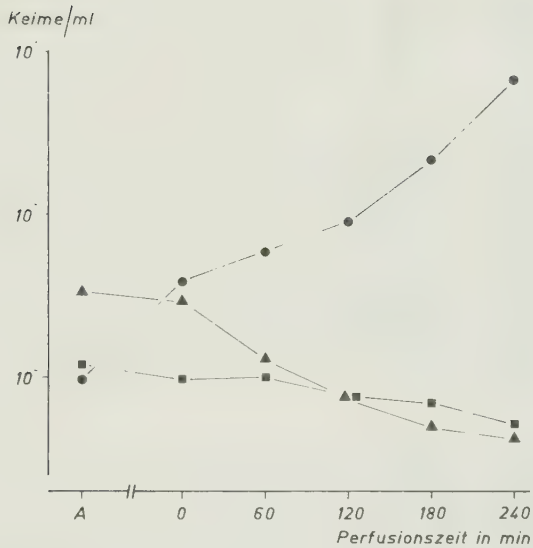


Abbildung 5: Durchschnittliche Keimzahl im Perfusionsmedium des isolierten Rattenhirns ohne und mit Tetracyclinzusatz.

Keime pro ml Medium (Ordinate) in Abhängigkeit von der Perfusionszeit (Abszisse). Das Medium wurde in allen Versuchen vor dem Rattenhirn entnommen.

A Zeitpunkt des Zirkulationsbeginns

●—● Perfusion ohne Tetracyclin (n = 8)

▲—▲ Perfusion mit 1,0 mg% Tetracyclin im Medium (n = 5)

■—■ Perfusion mit 0,5 mg% Tetracyclin im Medium (n = 3)

Tabelle 34: Versuche mit 0,5 mg% Tetracyclin: Keimartenbestimmung

Es wurden 3 Perfusionsversuche mit Zusatz von 0,5 mg% Tetracyclin zum Perfusionsmedium durchgeführt. Jeweils 10 Keime (dem Perfusionsmedium zu Beginn der Zirkulation aus dem Vorratsgefäß und während der Perfusion zu verschiedenen Zeitpunkten aus dem Perfusionskreislauf vor dem isoliert perfundierten Rattenhirn entnommen) wurden nach dem Schema der Tabelle 1 differenziert.

Perfusionsversuch	Entnahmezeit	Pseudo- monaden	Koliforme	sonst. gramneg. Stäbchen	grampos. Kokken	grampos. Stäbchen
Versuch 1	Zirkulationsbeginn	7	-	2	-	1
	Perfusionsbeginn	7	-	3	-	-
	60 min Perfusion	9	-	1	-	-
	120 min Perfusion	9	1	-	-	-
	180 min Perfusion	8	1	1	-	-
	240 min Perfusion	6	3	-	1	-
Versuch 2	Zirkulationsbeginn	7	3	-	-	-
	Perfusionsbeginn	9	1	-	-	-
	60 min Perfusion	10	-	-	-	-
	120 min Perfusion	9	1	-	-	-
	180 min Perfusion	10	-	-	-	-
	240 min Perfusion	10	-	-	-	-
Versuch 3	Zirkulationsbeginn	7	2	1	-	-
	Perfusionsbeginn	9	1	-	-	-
	60 min Perfusion	9	1	-	-	-
	120 min Perfusion	8	-	-	-	2
	180 min Perfusion	10	-	-	-	-
	240 min Perfusion	10	-	-	-	-

den Einzelversuchen ermittelten Keimzahlen. In der Abbildung 4 sind die durchschnittlichen Keimzahlen während der 3 Versuche mit 0,5 mg% Tetracyclin dargestellt.

Die Abbildung 5 zeigt im Vergleich die durchschnittlichen Keimzahlen vor dem isoliert perfundierten Rattenhirn während der Versuche mit 1,0 mg, 0,5 mg und ohne Tetracyclin in 100 ml Perfusionsmedium. Trotz des relativ großen Unterschiedes bezüglich der eingebrachten Keimmenge zu Beginn der Zirkulation nahmen während der Versuche mit 1,0 und mit 0,5 mg Tetracyclin nach 60 min Perfusion die durchschnittlichen Keimzahlen in vergleichbarer Weise ab.

Ähnlich wie bei den Versuchen mit 1,0 mg% Tetracyclin-zusatz befanden sich auch während der Versuche mit 0,5 mg% Tetracyclin unter den Keimen zu Beginn der Zirkulation überwiegend Pseudomonaden. Im Gegensatz zu den in Abschnitt 3.2. beschriebenen Versuchen nahm jedoch in dieser Versuchsreihe der relative Anteil der Pseudomonaden im allgemeinen zu. Nur während des Versuchs 1 blieb er relativ konstant (Tabelle 34).

3.3.2. Resistenzbestimmung

Dem veränderten Keimartenspektrum entsprach eine veränderte Sensibilität der untersuchten Keime gegen die getesteten Antibiotika (Tabelle 35 und 37). Wieder sollen nur die 5 Antibiotika, die in Abschnitt 3.1.2. die günstigsten Resultate zeigten, näher besprochen werden.

Tetracyclin (50 µg/Blättchen und 10 µg/Blättchen):

Wie in den vorangegangenen Versuchen waren gegen Tetra-

Tabelle 35: Durchschnittliche Häufigkeit sensibler Keime im Perfusionsmedium mit 0,5 mg% Tetracyclin.

Weitere Angaben siehe Legende zu Tabelle 19.

Entnahmestelle	Entnahmezeit	Tetracyclin (50 µg)				Tetracyclin (10 µg)				Chloramphenicol (50 µg)			
		$\bar{x}$	$x_{\max}$	$-x_{\min}$	$\bar{x}$	$x_{\max}$	$-x_{\min}$	$\bar{x}$	$x_{\max}$	$-x_{\min}$	$\bar{x}$	$x_{\max}$	$-x_{\min}$
Zubereitungsgefäß	Zirkulationsbeginn	9,7	1		9,0	0		9,0	2				
Perfusionskreislauf	Perfusionsbeginn	9,3	2		9,3	2		6,0	4				
Vor dem Rattenhirn	60 min Perfusion	8,7	4		8,7	4		7,3	5				
"	120 min Perfusion	10,0	0		8,3	5		9,7	1				
"	180 min Perfusion	10,0	0		10,0	0		9,3	1				
"	240 min Perfusion	9,7	1		9,0	2		9,3	2				

Tabelle 35 (Fortsetzung):

Entnahmestelle	Entnahmezeit	Erythromycin (10 µg)		Sulfadiazin (50 µg)		Carbenicillin (100 µg)	
		$\bar{x}$	$x_{\max} - x_{\min}$	$\bar{x}$	$x_{\max} - x_{\min}$	$\bar{x}$	$x_{\max} - x_{\min}$
Zubereitungsgefäß	Zirkulationsbeginn	5,3	7	2,7	1	3,0	2
Perfusionskreislauf	Perfusionsbeginn	4,7	4	0,7	2	1,7	1
Vor dem Rattenhirn	60 min Perfusion	7,0	3	3,7	5	3,0	4
"	120 min Perfusion	10,0	0	8,0	5	5,7	8
"	180 min Perfusion	9,7	1	7,3	2	5,0	4
"	240 min Perfusion	9,7	1	8,3	5	7,3	6

Tabelle 35 (Fortsetzung):

Entnahmestelle	Entnahmezeit	Trimethoprim/ Sulfamethoxazol (25 µg)		Gentamycin (10 µg)		Chloramphenicol (10 µg)	
		$\bar{x}$	$x_{\max} - x_{\min}$	$\bar{x}$	$x_{\max} - x_{\min}$	$\bar{x}$	$x_{\max} - x_{\min}$
Zubereitungsgefäß	Zirkulationsbeginn	6,0	6	6,3	7	3,7	4
Perfusionskreislauf	Perfusionsbeginn	4,0	2	6,0	4	1,0	1
Vor dem Rattenhirn	60 min Perfusion	3,7	6	2,3	3	2,0	2
"	120 min Perfusion	3,7	4	2,3	1	4,7	4
"	180 min Perfusion	1,7	5	1,3	3	4,3	5
"	240 min Perfusion	3,0	5	1,7	4	3,0	2

Tabelle 35 (Fortsetzung):

Entnahmestelle	Entnahmezeit	Neomycin (10 µg)		Polymycin B (300 E)		Nalidixinsäure (30 µg)	
		$\bar{x}$	$x_{\max} - x_{\min}$	$\bar{x}$	$x_{\max} - x_{\min}$	$\bar{x}$	$x_{\max} - x_{\min}$
Zubereitungsgefäß	Zirkulationsbeginn	5,0	6	5,7	8	4,7	4
Perfusionskreislauf	Perfusionsbeginn	6,0	4	6,0	4	1,7	5
Vor dem Rattenhirn	60 min Perfusion	2,3	3	2,0	2	1,3	2
"	120 min Perfusion	2,3	1	1,7	1	3,0	6
"	180 min Perfusion	1,3	2	1,0	2	3,3	4
"	240 min Perfusion	1,3	4	1,0	3	1,7	4

Tabelle 35 (Fortsetzung):

Entnahmestelle	Entnahmezeit	Ampicillin (25 µg)		Nitrofurantoin (200 µg)		Cephaloridin (5 µg)	
		$\bar{x}$	$x_{\max} - x_{\min}$	$\bar{x}$	$x_{\max} - x_{\min}$	$\bar{x}$	$x_{\max} - x_{\min}$
Zubereitungsgefäß	Zirkulationsbeginn	3,0	4	2,7	4	1,3	1
Perfusionskreislauf	Perfusionsbeginn	1,0	1	0,7	2	0,7	1
Vor dem Rattenhirn	60 min Perfusion	0,7	1	0,3	1	0,0	0
"	120 min Perfusion	1,0	2	1,0	2	0,7	2
"	180 min Perfusion	1,3	4	1,3	3	1,0	3
"	240 min Perfusion	1,7	3	0,7	2	1,0	3

Tabelle 35 (Fortsetzung):

Entnahmestelle	Entnahmezeit	Penicillin (1,5 E)		Cloxacillin (5 µg)	
		$\bar{x}$	$x_{\max}$	$\bar{x}$	$x_{\max}$
			min		min
Zubereitungsgefäß	Zirkulationsbeginn	1,7	2	1,7	2
Perfusionskreislauf	Perfusionsbeginn	0,0	0	0,0	0
Vor dem Rattenhirn	60 min Perfusion	0,0	0	0,0	0
"	120 min Perfusion	1,0	2	0,7	2
"	180 min Perfusion	0,3	1	0,3	1
"	240 min Perfusion	0,3	1	0,0	0

cyclin mehr Keime als gegen die anderen Antibiotika sensibel. Die Zahl der sensiblen Keime blieb während der Perfusionsdauer annähernd gleich.

Chloramphenicol (50 µg/Blättchen):

Gegen Chloramphenicol waren zu Beginn der Zirkulation mehr Keime empfindlich als in den Versuchen mit 1,0 mg% Tetracyclin. Auch blieb die Sensibilität der Keime während der Perfusionszeit gegen dieses Antibiotikum annähernd gleich.

Gentamycin (10 µg/Blättchen), Polymyxin B (300 E/Blättchen) und Neomycin (10 µg/Blättchen):

Diese 3 Antibiotika hemmten deutlich weniger Keime zu Beginn der Zirkulation als in den Versuchen mit 1,0 mg und ohne Tetracyclin in 100 ml Perfusionsmedium. Mit der Perfusionsdauer nahm die Zahl der sensiblen Keime gegen diese Antibiotika außerdem noch stark ab. Desgleichen nahm mit Perfusionsdauer die Zahl der sensiblen Keime gegen Trimethoprim/Sulfamethoxazol, Nalidixinsäure, Ampicillin, Nitrofurantoin, Penicillin und Cloxacillin ab. Eine Zunahme der sensiblen Keime wurde lediglich bei Erythromycin, Sulfadiazin und Carbenicillin beobachtet. Annähernd gleich blieb hingegen die durchschnittliche Häufigkeit sensibler Keime gegen Chloramphenicol (10 µg) und Cephaloridin.

Durch das veränderte Keimartenspektrum ergab sich auch eine veränderte Reihenfolge in der Wirksamkeit der getesteten Antibiotika (siehe Tabelle 37).

Tabelle 36: Durchschnittliche Häufigkeit differenzierter Keime im Perfusionsmedium mit 0,5 mg% Tetracyclin.

Jeweils 10 Keime (den Perfusionsmedien zu verschiedenen Zeitpunkten und an verschiedenen Stellen der Kreisläufe entnommen) wurden nach dem Schema der Tabelle 1 differenziert.

A Zeitpunkt des Zirkulationsbeginns. Bis zum Beginn der Perfusion zirkulierte das Medium 40 - 50 min in der Apparatur.

Keimarten	Durchschnittliche Häufigkeit differenzierter Keime						
	A	0	60	120	180	240	
Pseudomonaden	7,0	8,3	9,3	8,7	9,3	8,7	
koliforme	1,7	0,7	0,3	0,7	0,3	1,0	
Sonstige gramnegative Stäbchen	1,0	1,0	0,3	-	0,3	-	
Grampositive Kokken	-	-	-	-	-	0,3	
Grampositive Stäbchen	0,3	-	-	0,7	-	-	
Sonstige Keime	-	-	-	-	-	-	

Tabelle 37: Häufigkeit sensibler Keime im Perfusionsmedium mit 0,5 mg% Tetracyclin.

Isolierung von insgesamt 180 Keimen bei den Perfusionsversuchen mit 0,5 mg% Tetracyclin. Sensibilität gegen die genannten Pharmaka (Dosis/Blättchen in Klammern) mittels des Papierblättchen-Agardiffusionsverfahrens getestet.

n = Zahl der sensiblen Keime von 180 untersuchten Bakterien.

Antibakterielle Substanz	Häufigkeit sensibler Keime	
	n	%
Tetracyclin (50 µg)	172	95,6
Chloramphenicol (50 µg)	152	84,4
Gentamycin (10 µg)	60	33,3
Polymyxin B (300 E)	52	28,9
Tetracyclin (10 µg)	163	90,6
Neomycin (10 µg)	55	30,6
Nalidixinsäure (30 µg)	47	26,1
Chloramphenicol (10 µg)	56	31,1
Carbenicillin (100 µg)	77	42,8
Erythromycin (10 µg)	139	77,2
Nitrofurantoin (200 µg)	20	11,1
Sulfadiazin (50 µg)	92	51,1
Ampicillin (25 µg)	26	14,4
Trimethoprim/Sulfamethoxazol (25 µg)	66	36,7
Cephaloridin (5 µg)	14	7,8
Penicillin (1,5 E)	10	5,6
Cloxacillin (5 µg)	8	4,4

Diskussion

Langzeitperfusionen isolierter Organe sind in der Literatur häufig beschrieben worden. So perfundierten Katz et al. (1968) die isolierte Leber bis zu 5 Stunden, Koblet (1968), Miller et al. (1968) und Staib et al. (1968) bis zu 6 Stunden. Gordon (1968) beschreibt Leberperfusionen bis zu 10 Stunden. Isolierte Gehirne wurden von White et al. (1964) bis zu 7 Stunden und von Kriegstein et al. (1972) bis zu 10 Stunden perfundiert.

Die Bedingungen, unter denen die Langzeitperfusionen isolierter Organe mit semisynthetischen Medien ohne keimhemmenden Zusatz durchgeführt werden, bieten für das mikrobielle Wachstum im allgemeinen günstige Voraussetzungen. Das Perfusionsmedium mit Erythrozyten, Albumin, Glucose, verschiedenen physiologisch wichtigen Salzen und einem pH-Wert von 7,4 stellt einen ausgezeichneten Nährboden für viele Mikroorganismen dar. Die Perfusionstemperatur von 37 °C und die ständige Carbogenzufuhr begünstigen bestimmte Bakterienarten zusätzlich.

Die meisten Mikroorganismen werden zweifellos mit dem Perfusionsmedium, das aus nicht sterilen Bestandteilen zubereitet wird, in das Perfusionssystem eingeschleppt. Weitere Keime gelangen durch die Bestandteile der Perfusionsapparatur, z. B. durch das Frittenfiltergehäuse unserer Apparatur, das von Versuch zu Versuch nicht sterilisiert werden kann, in das Medium. Gegenüber diesen relativ starken Kontaminationsmöglichkeiten besitzen Luftkeime, die während des Versuchs vom isolierten Organ und vom Medium aufgenommen werden, keine nennenswerte Bedeutung.

Im Prinzip könnten Mikroorganismen die Funktion isolierter Organe dadurch beeinträchtigen, daß sie dem Perfusionsmedium wichtige Stoffe, wie z. B. Glucose, entnehmen oder toxische Stoffe an das Medium abgeben. Doch gibt es für die von uns beobachtete bakterielle Verunreinigung von 10^5 bis 10^6 Bakterien/ml nach 4 Stunden Perfusion noch keine Anzeichen dafür. Eine Keimzahl in dieser Größenordnung kann kaum zu einem wesentlichen Glucoseverbrauch im Medium führen (McIlwain et al. 1948, Thimann 1964). Desgleichen gibt es keinen sicheren Anhalt für die Wirkung von Bakterientoxinen an den isolierten Organen. Insbesondere werden offenbar in dieser Zeit von den Bakterien keine nachweisbaren Mengen von vasokonstriktorisches Substanzen freigesetzt, denn die Durchströmungsgeschwindigkeit bleibt über Stunden nahezu konstant. Auch eine so komplexe Funktion wie die spontane elektrische Aktivität des Gehirnes wird anscheinend durch die Anwesenheit der Keime nicht meßbar beeinflusst, denn es konnte gezeigt werden, daß sich das EEG des isolierten Rattenhirns über mehrere Stunden nahezu unverändert ableiten läßt (Kriegelstein et al. 1972). Somit scheint der Zusatz eines Antibiotikums zum Medium bei Perfusionsversuchen bis zu einer Perfusionszeit von 4 Stunden nicht notwendig.

Bei wesentlich länger dauernden Perfusionen kann aber ein Einfluß der Bakterien auf die Funktion isolierter Organe nicht mehr ausgeschlossen werden. Bei solchen Versuchen kann daher der Zusatz einer antibakteriellen Substanz wünschenswert werden. In unseren Versuchen hat sich ein Zusatz von Tetracyclin bewährt. Nach Zusatz von 1,0 mg bzw. 0,5 mg Tetracyclin/100 ml Perfusionsmedium wurden nach 4 Stunden Perfusion in allen Fällen niedrigere Keim-

zahlen als zu Beginn der Zirkulation des Mediums in der Perfusionsapparatur bestimmt. Ferner waren die meisten der isolierten Keime im Papierblättchen-Agardiffusionsverfahren noch weiterhin gegen Tetracyclin sensibel.

Die von uns verwendeten Tetracyclinkonzentrationen liegen im therapeutischen Konzentrationsbereich (Naumann 1962, Walter und Heilmeyer 1969, Helwig 1973).

Aber das dem Perfusionsmedium zugesetzte Tetracyclin könnte seinerseits die Funktion des isolierten Organs beeinflussen. EEG-Veränderungen, wie sie beim Menschen von Douthett et al. (1967) beschrieben wurden, erscheinen möglich. Auch sind vom Tetracyclin inhibitorische Wirkungen auf Enzyme verschiedener Organe beschrieben worden (Literatur bei Laskin 1967). Doch ist die Wirkung einer definierten Tetracyclinmenge leichter kalkulierbar als die Effekte, welche durch die großen Schwankungen unterliegende mikrobielle Wachstum hervorgerufen werden könnten.

Aus den vorliegenden Ergebnissen lassen sich insbesondere zwei Schlußfolgerungen ziehen:

1. Bis zu einer Perfusionszeit von 4 Stunden scheint der Zusatz einer antibakteriellen Substanz zum Perfusionsmedium nicht erforderlich zu sein.
2. Durch Zusatz von Tetracyclin in einer Konzentration von 0,5 mg/100 ml läßt sich eine Zunahme der Keimzahl verhindern.

Zusammenfassung

Im Perfusionsmedium des isolierten Rattenhirns wurde das Keimwachstum untersucht. Das verwendete Perfusionsmedium enthielt 30 % Rindererythrocyten, 2 g% Rinderserumalbumin und ungefähr 13 mM Glucose in Krebs-Henseleit-Lösung. Vor Perfusionsbeginn zirkulierte das Medium bis zu 2 Stunden in der Perfusionsapparatur, danach erfolgte die 4-stündige Perfusion des isolierten Rattenhirns. Zu verschiedenen Zeitpunkten des Versuchs und an verschiedenen Stellen des Perfusionskreislaufs wurden aus dem Medium Proben entnommen und darin die Keimzahl bestimmt. Am Ende der Perfusion wurden 10^5 bis 10^6 Bakterien pro ml Medium gefunden. Diese Größenordnung der bakteriellen Verunreinigung ließ den Zusatz einer antibakteriellen Substanz zum Medium bei Perfusionszeiten bis zu 4 Stunden nicht unbedingt erforderlich erscheinen. Trotzdem wurden aus den entnommenen Proben jeweils 10 Keime isoliert und auf ihre Sensibilität gegen 15 verschiedene antibakterielle Substanzen (Ampicillin, Carbenicillin, Cephaloridin, Chloramphenicol, Cloxacillin, Erythromycin, Gentamycin, Nalidixinsäure, Neomycin, Nitrofurantoin, Penicillin, Polymyxin B, Sulfadiazin, Tetracyclin und Trimethoprim + Sulfamethoxazol) geprüft. Tetracyclin hemmte das Wachstum der isolierten Keime am stärksten. Mit 1 mg bzw. 0,5 mg Tetracyclin pro 100 ml Medium konnte ein Anstieg der Keimzahl während der Perfusionsversuche verhindert werden.

Literaturverzeichnis

- Andjus, R.K., Suhara, K., Sloviter, H.A.: An isolated, perfused rat brain preparation, its spontaneous and stimulated activity. J. Appl. Physiol. 22, 1033 (1967),
- Bagglioni, M., Dewald, B. in (Staib, W. und Scholz, R., Hrg.) Stoffwechsel der isoliert perfundierten Leber. (S. 200) Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1968.
- Brauer, R.W., Pessotti, R.L., Pizzolato, P.: Isolated Rat Liver Preparation. Bile Production and Other Basic Properties. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 78, 174 (1951).
- Fleck, W., Krieglstein, J., und Urban, W.: Zwei Apparaturen zur Perfusion des isolierten Rattenhirns. Arzneim.-Forsch. 22, 1225 (1972).
- Geiger, A., Magnes, J.: The isolation of the cerebral circulation and the perfusion of the brain in the living cat. Amer. J. Physiol. 149, 517 (1947).
- Gordon, A.H.: in (Staib, W. und Scholz, R. Hrg.) Stoffwechsel der isoliert perfundierten Leber S. 90 Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1968.
- Hallmann, L.: Bakteriologie und Serologie. 2. Aufl. Stuttgart: Thieme 1961.
- Helwig, H.: Antibiotika-Chemotherapeutika, 2. Aufl. Stuttgart: Thieme 1973.
- Katz, J., Sellers, A.L., Bonarris, G. in: (Staib, W., Scholz, R., Hrg.) Stoffwechsel der isoliert perfundierten Leber. S. 100. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1968.

Krebs, K.H., Henseleit, K.: Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper. Hoppe-Seyler's Zschr. phys. Chem. 210, 33 (1932).

Krieglstein, G., Krieglstein, J., Urban, W.: Long survival time of an isolated perfused rat brain. Neurochem. 19, 885 (1973).

Krieglstein, J., Stock, R.: Comparative Study of the Effects of Chloral Hydrate and Trichloroethanol on Cerebral Metabolism. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 277, 323 (1973).

Laskin, A.I. in: (Gottlieb, D. und Shaw, P.D., Hrg.) Antibiotics. Volume I: Mechanism of Action. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1967.

Linzenmeier, G.: Die bakterielle Resistenzbestimmung. Ärztl. Lab. 8, 301 (1962).

Linzenmeier, G.: Welche Chemotherapeutika sollen bei der bakteriologischen Resistenzbestimmung getestet werden? Ärztl. Lab. 11, 272 (1965).

McIlwain, H., Roper, J.A., Hughes, D.E.: Relationships in Streptococci between Growth and Metabolism of Glutamine. Biochem. J. 42, 492 (1948).

Miller, L.L., John, D.W., Cloutier, P.F. in: (Staib, W. und Scholz, R., Hrg.) Stoffwechsel der isoliert perfundierten Leber, S. 77. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1968.

Naumann, P.: Antibiotica Blutspiegel und Resistenzbestimmung. Antibiotika et Chemotherapia 10, 1 (1962).

- Schimassek, H.: in (Staib, W. und Scholz, R., Hrg.)
Stoffwechsel der isoliert perfundierten Leber. S. 1
Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1968.
- Staib, W., Staib, R., Herrmann, J., Meiers, H.G. in:
(Staib, W. und Scholz, R., Hrg.) Stoffwechsel der
isoliert perfundierten Leber. S. 155. Berlin-Heidel-
berg-New York: Springer 1968.
- Thimann, K.V.: Das Leben der Bakterien. Dt. Ausgabe
nach einem Manuskript zur 2. erweiterten und ver-
besserten amerikanischen Auflage. Jena: Fischer 1964.
- Wallhäuser, K.H.: Die praktische Bedeutung des Anti-
biotika-Sensibilitätstestes. *Ärztl. Lab.* 16, 150 (1970).
- Walter, A.M., Heilmeyer, L.: Antibiotika-Fibel. 3. Aufl.
Stuttgart: Thieme 1969.
- White, R.J., Albin, M.S., Verdura: Preservation of
viability in the isolated monkey brain utilizing a
mechanical extracorporeal circulation. *Nature* 202,
1082 (1964).
- Willms, E., Söling, H.D. in: (Staib, W. und Scholz, R.,
Hrg.) Stoffwechsel der isoliert perfundierten Leber.
S. 118. Berlin-Heidelberg-New York 1968.
- Young, K., Houston, F.S., Pruden, J.F., Stirman, J.A.:
A perfusion technique for the study of liver metabolism.
J. Laborat. Clin. Med. 46, 155 (1955).

Lebenslauf

Am 26.9.1947 wurde ich als Sohn des Lehrers Kurt Jasch und seiner Ehefrau Edith Jasch, geborene Gursch in Rathenow geboren. Von 1954 bis 1961 besuchte ich in Rathenow die Friedrich-Ebert-Schule, ab 1961 in Wiesbaden die Oranienschule. Dort bestand ich am 15.6.1967 die Reifeprüfung. Im Wintersemester 1967/68 begann ich in Mainz an der Johannes-Gutenberg-Universität das Medizinstudium. Am 15.5.1970 heiratete ich Fräulein Ursula Peuser. Unsere Tochter Simone wurde am 20.10.1970 geboren. Vor dem Prüfungsausschuß in Mainz bestand ich am 28.6.1973 die Ärztliche Prüfung. Nach der Ableistung meiner Medizinalassistentenzeit am Pharmakologischen Institut der Universität Mainz, am Herz-Jesu-Krankenhaus in Dernbach, an der II. Medizinischen Klinik der Universität Mainz und am Paulinenstift in Wiesbaden erhielt ich am 1.7.1974 meine Approbation als Arzt.

Kurz vor meiner Approbation erkrankte ich an einer akuten Virushepatitis. Nach Genesung arbeite ich seit dem 1.10.1974 als Assistenzarzt an der II. Medizinischen Klinik der Kliniken der Landeshauptstadt Wiesbaden.

Herrn Professor Dr. Dr. J. Krieglstein und Herrn Professor Dr. F. Selenka danke ich für die Überlassung des Themas und für ihre großzügige Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Für die Hilfe bei der Ausführung der Experimente danke ich Fräulein H. Seufert und meiner Ehefrau.

Danken möchte ich auch Herrn Diplompsychologen Wellek für seine statistische Beratung.

